



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE XILANASA  
BACTERIANA A PARTIR DE *Bacillus sp. K1* UTILIZANDO  
RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS EN EL DEPARTAMENTO DE  
BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAKEHEAD, CANADÁ”**

**Trabajo de Titulación**

**Tipo: Proyecto de Investigación**

Presentado para alcanzar el grado académico de:

**INGENIERO QUÍMICO**

**AUTOR: TERRY MIGUEL SOLIS CARRANZA**

**TUTORA: ING. CRISTINA GABRIELA CALDERÓN TAPIA**

Riobamba - Ecuador

2018

**©2017, Terry Miguel Solis Carranza**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE INGENIERIA QUÍMICA**

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que: el trabajo de titulación: Tipo Investigación “OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE XILANASA BACTERIANA A PARTIR DE *Bacillus sp. K1* UTILIZANDO RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAKEHEAD, CANADÁ”, de responsabilidad del señor TERRY MIGUEL SOLIS CARRANZA, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Cristina Calderón Msc.

.....

.....

**DIRECTORA DEL TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

Ing. Paul Palmay Msc.

.....

.....

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Yo, TERRY MIGUEL SOLIS CARRANZA soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Terry Miguel Solis Carranza

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación es fruto de varios meses de esfuerzo y dedicación para comprender una de las vías por la cual la naturaleza puede aprovecharse con la finalidad de reducir el impacto negativo de la vida humana sobre el planeta. Por esta razón dedico mi tesis a los investigadores que hallen en ella información útil para proyectos en esta línea, o simplemente, la inspiración para encontrar procesos cada vez más eficientes que permitan mejorar nuestra calidad de vida en armonía con el medio ambiente que nos rodea.

Terry

## **AGRADECIMIENTO**

Al dar una mirada retrospectiva hacia el instante en el cual decidí tomar a la Ingeniería Química como opción para mi futuro profesional al servicio de la sociedad, llegan a mi mente innumerables recuerdos de personas que me ofrecieron su apoyo incondicional a lo largo de este camino. Entre ellos hago una mención especial a mis padres Mónica y David quienes con su consejo a pesar de la distancia supieron encontrar las palabras adecuadas para ayudarme a superar mis momentos de flaqueza. Mis abuelitos, María Elicena y Luis junto con mi tío Fredy que un fin de semana tras otro esperaban mi llegada de vuelta con noticias de mi progreso. Mis tíos Klever y Jhoana con quienes compartí la mitad de mi vida universitaria entre gratas y difíciles circunstancias. A los amigos que esta carrera me permitió conocer, quienes más que mis futuros colegas fueron mis compañeros de vida durante los últimos años.

Finalmente quiero agradecer a mis maestros, tutores, Ing. Cristina e Ing. Paul, y a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por su papel fundamental en el proceso de selección para la beca Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP) ofertada por el gobierno canadiense. Esta oportunidad me permitió ampliar mis perspectivas sobre la ciencia y desarrollar mi tesis bajo la supervisión del Dr. Wensheng Qin and Dr. Yang Liu en la Universidad de Lakehead.

Terry

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Identificación del problema</b> .....	1
<b>1.2. Justificación de la investigación</b> .....	2
<b>1.3. Objetivos</b> .....	4
<b>1.3.1. General</b> .....	4
<b>1.3.2. Específicos</b> .....	4
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	5
<b>2.1. Antecedentes de la investigación</b> .....	5
<b>2.2. Marco conceptual</b> .....	8
<b>2.2.1. Actividad enzimática</b> .....	8
<b>2.2.2. Ensayo de densidad óptica</b> .....	9
<b>2.2.3. Ensayo de Miller</b> .....	9
<b>2.2.4. Espectrofotometría</b> .....	10
<b>2.2.5. Espectrofotómetro de microplacas Epoch™</b> .....	10
<b>2.2.6. Fermentación sumergida</b> .....	12
<b>2.2.7. Inhibidores enzimáticos</b> .....	13
<b>2.2.8. Lignocelulosa</b> .....	13
<b>2.2.9. Medio de cultivo</b> .....	14
<b>2.2.10. Medio Luria- Bertani (LB)</b> .....	15
<b>2.2.11. Medio mínimo de sales (MSM)</b> .....	15
<b>2.2.12. Producción de etanol de segunda generación</b> .....	15
<b>2.2.13. Surfactantes</b> .....	17
<b>2.2.13.1. Surfactantes iónicos</b> .....	17
<b>2.2.13.1.1. Dodecil sulfato de sodio</b> .....	18
<b>2.2.13.2. Surfactantes no iónicos</b> .....	18
<b>2.2.13.2.2. Familia del Tritón</b> .....	18
<b>2.2.13.2.3. Familia del polisorbato o Tween</b> .....	19
<b>2.2.13.3. Surfactantes zwitteriónicos</b> .....	20
<b>2.2.13.4. Elección de surfactantes</b> .....	20
<b>2.2.14. Xilanasa</b> .....	21

2.2.15.	<i>Xilano</i> .....	22
<b>CAPÍTULO III</b>		
3.	<b>METODOLOGÍA</b> .....	23
3.1.	<b>Hipótesis y especificación de Variables</b> .....	23
3.1.1.	<i>Hipótesis general</i> .....	23
3.1.2.	<i>Hipótesis específicas</i> .....	23
3.1.3.	<i>Identificación de variables</i> .....	24
3.1.3.1.	<i>Variables independientes:</i> .....	24
3.1.3.4.	<i>Variables dependientes:</i> .....	25
3.1.4.	<i>Operacionalización de variables</i> .....	26
3.1.5.	<i>Matriz de consistencia</i> .....	28
3.2.	<b>Tipo y diseño de la investigación</b> .....	32
3.3.	<b>Unidad de análisis</b> .....	33
3.4.	<b>Población de estudio</b> .....	33
3.5.	<b>Tamaño de muestra</b> .....	33
3.6.	<b>Selección de muestra</b> .....	33
3.7.	<b>Técnicas de recolección de datos</b> .....	33
3.7.6.	<i>Cepa bacteriana y su activación</i> .....	33
3.7.7.	<i>Cultivo de la cepa bacteriana</i> .....	34
3.7.8.	<i>Densidad óptica y medición de la actividad enzimática</i> .....	34
3.7.8.1.	<i>Construcción de la curva de calibración</i> .....	34
3.7.8.2.	<i>Medición de la densidad óptica</i> .....	35
3.7.8.3.	<i>Extracción de la enzima cruda</i> .....	35
3.7.8.4.	<i>Ensayo de actividad enzimática para xilanasa</i> .....	35
3.7.9.	<i>Optimización de las condiciones de fermentación</i> .....	37
3.7.9.1.	<i>Optimización del pH</i> .....	37
3.7.9.2.	<i>Optimización del volumen de inóculo</i> .....	37
3.7.9.3.	<i>Optimización de la temperatura de fermentación</i> .....	37
3.7.10.	<i>Optimización del medio de fermentación</i> .....	37
3.7.10.1.	<i>Optimización de la fuente de carbono</i> .....	37
3.7.10.2.	<i>Optimización de la fuente de nitrógeno</i> .....	37
3.7.10.3.	<i>Relación entre la concentración fuente de nitrógeno/ carbono</i> .....	38
3.7.11.	<i>Efecto de iones metálicos y surfactantes</i> .....	38
3.7.12.	<i>Análisis estadístico</i> .....	38
<b>CAPÍTULO IV</b>		
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	40
4.1.	<b>Análisis de resultados</b> .....	40



<b>4.1.1.</b>	<b><i>Curva de calibración de xilosa</i></b> .....	40
<b>4.1.2.</b>	<b><i>Análisis periódico de la densidad óptica y producción de xilanasa durante seis días de incubación.</i></b> .....	41
<b>4.1.3.</b>	<b><i>Optimización de las condiciones de fermentación</i></b> .....	42
4.1.3.1.	<i>Optimización del pH de fermentación</i> .....	42
4.1.3.2.	<i>Optimización del volumen de inóculo</i> .....	43
4.1.3.3.	<i>Optimización de la temperatura de fermentación</i> .....	44
<b>4.1.4.</b>	<b><i>Optimización de la fuente de carbono</i></b> .....	45
4.1.4.1.	<i>Optimización de la naturaleza de la fuente de carbono</i> .....	45
4.1.4.1.1.	<i>Residuos lignocelulósicos</i> .....	46
4.1.4.1.2.	<i>Azúcares purificadas</i> .....	46
4.1.4.2.	<i>Optimización de la concentración de la fuente de carbono</i> .....	47
<b>4.1.5.</b>	<b><i>Optimización de las fuentes de nitrógeno</i></b> .....	48
4.1.5.1.	<i>Optimización de la naturaleza de la fuente de nitrógeno inorgánico</i> .....	48
4.1.5.2.	<i>Optimización de la concentración de la fuente de nitrógeno inorgánico</i> .....	48
4.1.5.3.	<i>Optimización de la naturaleza de la fuente de nitrógeno orgánico</i> .....	49
<b>4.1.6.</b>	<b><i>Optimización de la relación entre las fuentes de carbono y nitrógeno</i></b> .....	49
<b>4.1.7.</b>	<b><i>Evaluación de la adición de iones metálicos y surfactantes</i></b> .....	50
4.1.7.1.	<i>Efecto de la adición de iones metálicos</i> .....	50
4.1.7.2.	<i>Efecto de la adición de surfactantes</i> .....	51
<b>4.2.</b>	<b><i>Pruebas de hipótesis</i></b> .....	51
<b>4.2.1.</b>	<b><i>Hipótesis general</i></b> .....	51
<b>4.2.2.</b>	<b><i>Hipótesis específicas</i></b> .....	53
4.2.2.1.	<i>Hipótesis 1</i> .....	53
4.2.2.2.	<i>Hipótesis 2</i> .....	54
4.2.2.3.	<i>Hipótesis 3</i> .....	57
4.2.2.4.	<i>Hipótesis 4</i> .....	60
4.2.2.5.	<i>Hipótesis 5</i> .....	63
4.2.2.6.	<i>Hipótesis 6</i> .....	64
<b>4.3.</b>	<b><i>Discusión de resultados</i></b> .....	66
<b>CONCLUSIONES</b> .....		69
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		70
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....		71
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2:</b> Investigaciones previas sobre producción de xilanasa microbiana(IU/mL)con distintas condiciones de temperatura (°C), pH, medios de cultivo y técnicas de fermentación. ...	6
<b>Tabla 2-2:</b> Contenido porcentual (%) de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos.....	14
<b>Tabla 1-3:</b> Operacionalización de Variables.....	26
<b>Tabla 2-3:</b> Matriz de consistencia.....	28
<b>Tabla 1-4:</b> Absorbancias (A) promedios y correspondientes diferencias con el experimento de control a distintas concentraciones de xilosa entre 0 y 1000 µg/mL. ....	40
<b>Tabla 2-4:</b> Densidad óptica (OD) de las muestras en función del tiempo de incubación en h..	41
<b>Tabla 3-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función del tiempo de incubación en h. ....	42
<b>Tabla 4-4:</b> Densidad óptica (OD) de las muestras en función del pH a 36 h de fermentación.	42
<b>Tabla 5-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función del pH a 36 h de fermentación. ....	43
<b>Tabla 6-4:</b> Densidad óptica (OD) de las muestras en función del volumen de inóculo (% v/v). ....	43
<b>Tabla 7-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función del volumen de inóculo (% v/v). ....	44
<b>Tabla 8-4:</b> Densidad óptica (OD) de las muestras en función de la temperatura de fermentación (°C).....	44
<b>Tabla 9-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la temperatura de fermentación (°C). ....	45
<b>Tabla 10-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en cinco residuos lignocelulósicos al 1% de concentración. ....	46
<b>Tabla 11-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en cinco azúcares purificadas al 1% de concentración.....	47
<b>Tabla 12-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la concentración de afrecho de trigo (% m/v). ....	47
<b>Tabla 13-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en cinco fuentes inorgánicas de nitrógeno (1%).....	48
<b>Tabla 14-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la concentración de nitrato de amonio (% m/v).....	48

<b>Tabla 15-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas con el uso de cinco fuentes orgánicas de nitrógeno (1%).	49
<b>Tabla 16-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la relación entre las fuentes de carbono y nitrógeno	50
<b>Tabla 17-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la adición 1mM de iones metálicos.	50
<b>Tabla 18-4:</b> Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la adición 0,1% de surfactantes.	51
<b>Tabla 19-4:</b> Comparación de la actividad enzimática de xilanasa bacteriana (IU/ Lmin) producida con las variables iniciales y finales asociadas a la fermentación.	52
<b>Tabla 20-4:</b> Comparación de la actividad enzimática de xilanasa relativa (%) de iones metálicos añadidos en concentración 1mM con respecto al experimento de control.	64
<b>Tabla 21-4:</b> Comparación de la actividad enzimática de xilanasa relativa (%) de surfactantes añadidos en concentración 0,1% con respecto al experimento de control.	65

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1-2:</b> Espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ de BioTek. ....	12
<b>Figura 2-2:</b> Fermentación sumergida de xilano.....	13
<b>Figura 3-2:</b> Representación esquemática para la conversión de biomasa lignocelulósica en bioetanol .....	16
<b>Figura 4-2:</b> Estructura y fórmula del surfactante dodecil sulfato de sodio .....	18
<b>Figura 5-2:</b> Estructura y fórmula del surfactante Triton X-100.....	19
<b>Figura 6-2:</b> Estructura y fórmulas de los surfactantes Tween-20 y Tween-80.....	20
<b>Figura 7-2:</b> Estructura del xilano y las enzimas xilanolíticas involucradas en su degradación.....	22

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-4:</b> Curva de calibración de xilosa obtenida por regresión lineal.....	41
<b>Gráfico 2-4:</b> Producción periódica de xilanasa y densidad óptica en función del tiempo de incubación cada 12 h por 6 días (144 h). .....	54
<b>Gráfico 3-4:</b> Optimización del pH de fermentación mediante la comparación de la actividad enzimática relativa y densidad óptica. ....	55
<b>Gráfico 4-4:</b> Optimización del volumen de inóculo mediante la comparación de la actividad enzimática relativa y densidad óptica. ....	56
<b>Gráfico 5-4:</b> Optimización de la temperatura de fermentación mediante la comparación de la actividad enzimática relativa y densidad óptica.....	57
<b>Gráfico 6-4:</b> Optimización de la naturaleza de la fuente de carbono mediante la comparación de la actividad enzimática relativa de residuos lignocelulósicos al 1% con xilano purificado. ....	58
<b>Gráfico 7-4:</b> Optimización de la naturaleza de la fuente de carbono mediante la comparación de la actividad enzimática relativa de azúcares purificadas al 1%.....	59
<b>Gráfico 8-4:</b> Optimización de la concentración de la fuente de carbono mediante la comparación de la actividad enzimática en porcentajes de afrecho trigo con glucosa a 0,5%.....	60
<b>Gráfico 9-4:</b> Optimización de la naturaleza de la fuente de nitrógeno inorgánico mediante la comparación de la actividad enzimática con diferentes sustancias a 1% m/v. .	61
<b>Gráfico 10-4:</b> Optimización de la concentración de nitrato de amonio mediante la comparación de la actividad enzimática de diferentes porcentajes m/v de la sustancia. ....	62
<b>Gráfico 11-4:</b> Optimización de la naturaleza de la fuente de nitrógeno orgánico mediante la comparación de la actividad enzimática con diferentes sustancias a 1% m/v. ....	63
<b>Gráfico 12-4:</b> Optimización de la relación entre la concentración de las fuentes de nitrógeno y carbono mediante la comparación de la actividad enzimática con diferentes sustancias a 1% m/v. ....	64

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo A** Registro de los análisis realizados

**Anexo B** Aprobación del proyecto de investigación por parte del departamento de biología de la universidad de Lakehead, Ontario, Canadá.

**Anexo C** Detalle de los procedimientos experimentales

## RESUMEN

El objetivo de presente trabajo de titulación fue verificar y optimizar la producción de xilanasa por parte de la bacteria *Bacillus sp. K1* en el Departamento de Biología de la Universidad de Lakehead, Canadá. Las variables investigadas para la optimización fueron físicas tales como pH, temperatura y volumen de inóculo; y de composición del medio de fermentación tales como fuente de carbono, fuente de nitrógeno orgánico e inorgánico y relación porcentual entre dichos componentes. Adicionalmente, se determinó el efecto de iones metálicos (sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso, níqueloso, cúprico, cobaltoso y manganeso) y surfactantes (Polisorbato-20, dodecil sulfato de sodio y Triton X-100) en la actividad enzimática de la xilanasa producida. La mayor producción de xilanasa fue tras 36h de fermentación y las condiciones físicas óptimas asociadas a la producción de xilanasa fueron pH 6, temperatura 35 °C y volumen de inóculo 1%. La composición óptima del medio de fermentación determinada está constituida por: Afrecho de trigo 4%, Glucosa 0.5%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, KCl 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, peptona 0.5%, SDS 0.1%. La actividad enzimática generada es de 264.96±7.89 IU/L, con un 248,79% de incremento con respecto al inicial. Los inhibidores más importantes fueron los iones cúprico y manganeso con 32% y 49,16% de inhibición comparado con el experimento de control. Las condiciones físicas de fermentación y la presencia de celulasa favorecen una futura aplicación en la industria del bioetanol de segunda generación.

**Palabras clave:** <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <FERMENTACIÓN SUMERGIDA>, <XILANASA>, <RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS>, <BIOETANOL>, <BACTERIA (*Bacillus sp. K1*)>

## ABSTRACT

The objective of the present work of titration was to verify and optimize the xylanase production by the bacteria *Bacillus sp. K1* in the Department of Biology at Lakehead University, Canada. The variables investigated for optimization were physical such as pH, temperature and inoculum volume; and composition of the fermentation medium such as carbon source, organic and inorganic nitrogen source and percentage ratio between these components. Additionally, the effect of metal ions (sodium, potassium, magnesium, calcium, ferrous, nickelous, cupric, cobaltous and manganous) and surfactants (polysorbate-20, dodecyl sodium sulfate and Triton X-100) in the enzymatic activity of the xylanase produced was determined. The highest production of xylanase was after 36h fermentation and the optimal physical conditions associated with the production of xylanase were pH 6, temperature 35 °C and inoculum volume 1%. The optimum composition of the fermentation media consists of: wheat bran 4%, glucose 0.5%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, KCl 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, peptone 0.5%, SDS 0.1%. The enzyme activity generated is 264.96±7.89 IU/L, with a 248,79% from the initial experiment. The most important inhibitors were cupric and manganous ions with 32% and 49,16% inhibition compared to the control experiment. The physical conditions of fermentation and the presence of cellulase provide a future application in the second-generation bioethanol industry.

**Keywords:** <EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <SUBMERGED FERMENTATION>, <XYLANASE>, <LIGNOCELLULOSIC RESIDUES>, <BIOETHANOL>, <BACTERIA (*Bacillus sp. K1*)>



# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Identificación del problema

La lignocelulosa es el principal y más abundante componente de la biomasa renovable producida por la fotosíntesis, según reportes del 2006 anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas, et al., 2006, p. 484).

Los tres principales componentes que constituyen los sustratos lignocelulósicos son celulosa, hemicelulosa y lignina. Las hemicelulosas están compuestas de complejas mezclas de xilano, xiloglucano, glucomanano, arabinogalactano y otros heteropolímeros (Verma & Satyanarayana, 2012, p. 361).

El xilano es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, representando aproximadamente un tercio del carbono orgánico renovable de la Tierra (Collins, et al., 2015, p. 3). La enzima xilanasa (endo-1,4-  $\beta$ -D-xilanhidrolasa; EC 3.2.1.8) degrada el xilano, hidrolizando sus enlaces  $\beta$ -1,4, conduciendo a productos tales como xilosa y xilobiosa (Bernier, et al., 1983, p. 511).

El presente estudio se enfoca en el análisis y optimización de los parámetros involucrados en la producción de xilanasa bacteriana por la cepa *Bacillus sp. K1*, la cual ha sido previamente aislada de muestras de madera en estado de putrefacción en el laboratorio de Biotecnología para Enzimas, Bioproductos y Biocombustibles de la Universidad de Lakehead, utilizando como sustrato diferentes residuos lignocelulósicos.

## **1.2. Justificación de la investigación**

En la actualidad el uso de las xilanasas a escala industrial tiene un campo muy amplio de aplicación. Entre estos se encuentra el blanqueo de la pulpa en la industria papelera, clarificación de jugos, bioconversión de residuos lignocelulósicos y desechos agrícolas en productos fermentables, mejoramiento de la consistencia de la cerveza y digestibilidad de alimentos balanceados para animales (Wong, et al., 1988, p. 306).

Las xilanasas también pueden ser aplicadas en la producción de rayón, celofán y varios productos químicos como esteres y éteres de celulosa, los cuales son todos producidos por la disolución de pulpa y purificación de las fibras de otros carbohidratos (Subramaniyan & Prema, 2002, p. 34).

Entre las aplicaciones citadas se destaca el uso de xilanasas como sustituto de compuestos clorados para el blanqueo de pulpa Kraft en la producción de papel. Este proceso tradicionalmente genera grandes cantidades de aguas residuales cargadas de compuestos órgano-clorados, de características tóxicas, mutagénicas y resistencia a la biodegradación, además de ser una de las mayores fuentes de contaminación ambiental a nivel industrial. (Subramaniyan & Prema, 2002, p. 34).

El empleo de enzimas en este proceso es llamado biobleaching. Debido a que la hemicelulosa es más fácil de hidrolizar que la lignina, el biobleaching es más efectivo con el uso de xilanasas que con el uso de enzimas que degradan lignina (Subramaniyan & Prema, 2002, p. 34).

Existen investigaciones enfocadas en la producción de biocombustibles de segunda generación, los cuales son los principales productos de la bioconversión de materiales lignocelulósicos. “El etanol es el combustible renovable más importante en términos de volumen y valor de mercado” (Taherzadeh & Karimi, 2008, p. 708).

Al contrario de la producción de etanol de primera generación de caña de azúcar o almidón, el etanol de segunda generación solo ha sido probado en plantas piloto (Karimi & Taherzadeh, 2007, p. 708). A diferencia de los biocombustibles de primera generación, los de segunda generación se caracterizan por no competir con la producción alimentaria y proveen beneficios económicos, ambientales y estratégicos para la producción de biocombustibles (Viikari, et al., 2012, p. 2).

El uso de xilanasas en la producción de etanol de segunda generación puede incrementar su efectividad, debido a que aprovecha la hemicelulosa, convirtiéndola en xilosa, la cual es un

azúcar fermentable. El uso de xilano purificado como sustrato para la producción de xilanasas no es económicamente viable (Jain, 1995, p. 706). Adicionalmente, la información puede ser corroborada con proveedores en línea, donde el precio de xilano bordea los 1125\$ por kg (Biosynth, Chemistry and Biology, 2017, p. 1).

En este contexto el presente estudio se enfoca en la optimización de la producción de xilanasas a partir de una cepa bacteriana aislada por el personal del laboratorio para enzimas, bioproductos y biorremediación de la universidad previamente citada. Seguido de la evaluación de la efectividad de diversos subproductos agroindustriales lignocelulósicos de bajo costo ricos en hemicelulosa, como sustratos para el cultivo de la cepa *Bacillus sp. K1* y la consecuente producción de xilanasas bacterianas.

Además, el presente proyecto de investigación fue llevado a cabo en la Universidad de Lakehead, provincia de Ontario, Canadá debido a que me hice acreedor mediante un riguroso proceso de selección a la beca “Emerging Leaders in the Americas Program” ofertada por el gobierno canadiense y canalizada por los convenios vigentes entre la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo con la universidad mencionada.

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. General

Optimizar la producción de xilanasa bacteriana a partir de *Bacillus sp. K1* utilizando residuos lignocelulósicos en el Departamento de Biología de la Universidad de Lakehead, Canadá.

#### 1.3.2. Específicos

- Verificar la producción de xilanasa bacteriana por parte de la cepa *Bacillus sp. K1* mediante el análisis de su actividad enzimática en función del tiempo de incubación.
- Determinar las condiciones óptimas (pH, temperatura y volumen del inóculo) para el cultivo de la cepa *Bacillus sp. K1* en xilano purificado de espelta y avena.
- Comparar el efecto de cinco tipos de residuos lignocelulósicos y cinco azúcares purificadas con el uso de xilano purificado de avena y espelta, como sustrato para el cultivo de la cepa *Bacillus sp. K1*, en la actividad enzimática de la xilanasa bacteriana producida.
- Evaluar el efecto de cinco fuentes orgánicas de nitrógeno y cinco inorgánicas diferentes, para el cultivo de la cepa *Bacillus sp. K1*, en la actividad enzimática de la xilanasa bacteriana producida.
- Determinar la relación óptima entre la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno a utilizar en cultivo de la cepa *Bacillus sp. K1*.
- Identificar el efecto de los iones metálicos (sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso, níqueloso, cúprico, cobaltoso y manganoso) y los surfactantes (Polisorbato-20, dodecil sulfato de sodio y Triton X-100) en la actividad enzimática de la xilanasa bacteriana producida.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la investigación

El xilano es el principal componente contenido en la hemicelulosa, el cual requiere la acción sinérgica de varias enzimas hemicelulolíticas para su completa conversión en monosacáridos. La principal enzima asociada a este proceso es la endo-1,4-  $\beta$ -xilanasasa, la cual hidroliza los enlaces glicosídicos entre xilósidos, generando xilooligosacáridos de cadena corta (Motta, et al., 2013, p. 254).

La conversión enzimática de xilano en productos con valor agregado, representa parte de los esfuerzos para fortalecer económicamente el procesamiento de biomasa lignocelulósica, y a su vez desarrollar nuevas fuentes energéticas a partir de recursos renovables (Motta, et al., 2013, p. 254).

En este contexto varios microorganismos han sido considerados como una buena fuente de enzimas debido a que se multiplican a velocidades extremadamente altas y sintetizan productos biológicamente activos que pueden ser controlados por seres humanos.

Estas enzimas ofrecen ventajas sobre el uso convencional de catalizadores químicos por varias razones: exhiben altas actividades catalíticas y especificidad en el sustrato, son biodegradables y pueden ser producidos a gran escala con mínimo impacto ambiental y alta viabilidad económica (Gote, 2004).

Los principales estudios previos en la producción de xilanasas a partir de varios microorganismos se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 1-2:** Investigaciones previas sobre producción de xilanasa microbiana (IU/mL) con distintas condiciones de temperatura (°C), pH, medios de cultivo y técnicas de fermentación.

Microorganismo	Actividad de Xilanasa	Condiciones de Cultivo		Medio de Cultivo	Técnica de Fermentación	Referencia Bibliográfica
		pH	Temperatura			
<i>Streptomyces sp. P12-137</i>	27,8	7.2	28	Afrecho de trigo y nitrato de potasio	Fermentación en estado sólido	(Coman & Bahrim, 2011, p. 773)
<i>Penicillium fellutanum</i>	39,7	7	30	Xilano de avena y espelta; úrea, peptona y extracto de levadura	Fermentación Sumergida	(Palaniswamy, et al., 2008, p. 1978)
<i>Acremonium furcatum</i>	33,1	7	30	Xilano de avena y espelta; úrea, peptona y extracto de levadura	Fermentación Sumergida	(Palaniswamy, et al., 2008, p. 1978)
<i>Bacillus circulans D1</i>	8,4	9	45	Bagazo hidrolizado.	Fermentación Sumergida.	(Bocchini, et al., 2005, p. 3653)
<i>Streptomyces sp. strain Ib 24 D</i>	1447,0	7,5	28	Orujo de tomate.	Fermentación en estado sólido.	(Rawashdeh, et al., 2005, p. 251)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	12,954	7,5	70	Afrecho de trigo; triptona	Fermentación Sumergida.	(Sharma, et al., 2007, p. 483)
<i>Bacillus pumilus</i>	5407	8	37	Afrecho de trigo; Peptona + Extracto de levadura + nitrato de	Fermentación Sumergida.	(Battan, et al., 2007, p. 733)

				potasio		
<b><i>Fusarium Oxysporum</i></b>	46,2	3,0- 3,5	30	Afrecho de trigo; Peptona	Fermentación Sumergida.	(Chander, et al., 1998 , p. 641)
<b><i>Penicillium oxalicum</i></b>	3,89	8	45	Afrecho de trigo; extracto de levadura	Fermentación en estado sólido.	(Muthezhilan, et al., 2007, p. 20)
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>	48,93	8	35	Sacarosa; Peptona y sulfato de amonio	Fermentación Sumergida.	(Irfan, et al., 2016, p. 139)
<b><i>Bacillus megaterium</i></b>	43,66	8	40	Xilosa; Extracto de malta y nitrato de potasio.	Fermentación Sumergida.	(Irfan, et al., 2016, p. 139)

Realizado por: Terry Solis, 2018.

La información citada indica que existen gran variedad de cepas tanto fúngicas como bacterianas, las cuales han sido sometidas a diversas condiciones de cultivo para optimizar la producción de xilanasa según el propósito de su futura aplicación. Para su fermentación se utiliza dos técnicas diferentes de fermentación: en estado sólido o sumergida

Los resultados finales de la actividad enzimática difieren significativamente entre si debido a varios factores: metodología de ensayos enzimáticos, unidades adoptadas, características de las cepas microbianas, entre otros.

## **2.2. Marco conceptual**

### ***2.2.1. Actividad enzimática***

Es una propiedad que se define como la medida de la tasa de conversión de una reacción química específica, que la enzima cataliza en un sistema de ensayo específico (Cornish-Bowden, 2014, p. 80).

La actividad enzimática es generalmente determinada como la cantidad de sustrato convertido o producto formado por unidad de tiempo. De acuerdo con el sistema internacional de unidades la concentración debe estar en moles y el tiempo en segundos, de esta manera 1 katal (1 kat) se define como la cantidad de enzima que convierte una mol de sustrato, formando respectivamente 1 mol de producto/s (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada , 1981, p. 755).

Sin embargo, la unidad internacional (IU) continúa siendo de uso común, incluso la mayoría de proveedores ofrecen aún enzimas en IU; 1 IU se define como la cantidad de enzima que convierte 1 $\mu$ mol de sustrato (o forma 1  $\mu$ mol de producto) /min (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada , 1981, p. 755).

Las unidades derivadas son la actividad catalítica específica, que consiste en la actividad enzimática dividida por la masa de proteína presente, y la actividad catalítica molar, la cual divide la actividad enzimática por el número de moles de centros catalíticos en la enzima o de moléculas multi-centros (Cornish-Bowden, 2014, p. 80).



### **2.2.2. Ensayo de densidad óptica**

Las fases del crecimiento en cultivos bacterianos (adaptación, logarítmica, estacionaria y muerte) están bien documentadas, la fase logarítmica es el punto donde las bacterias se reproducen tan rápido como les es posible (Caldwell, 1995, p. 56).

El uso de la espectrofotometría para medir la densidad óptica a 600 nm (OD600) de un cultivo bacteriano con la finalidad monitorear el crecimiento ha sido siempre una técnica importante en microbiología (Matlock, et al., 2007, p. 1).

Las aplicaciones más comunes donde el ensayo OD600 es utilizado son las siguientes:

- a) Determinación y estandarización del tiempo óptimo para inducir el cultivo durante los protocolos de expresión proteica.
- b) Determinación y estandarización de la concentración de inóculo para experimentos de concentración mínima inhibitoria (MIC).
- c) Determinación del tiempo óptimo de cultivo para preparar células competentes (Matlock, et al., 2007, p. 1).

### **2.2.3. Ensayo de Miller**

Para la determinación de azúcares según el método Miller, los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. Cuando el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él, se desarrolla un cambio de color parecido al café (con variaciones de amarillo hasta café) (Carrillo, 2016, p. 1).

El cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica, leídas por espectrofotometría a una determinada longitud de onda. La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determina haciendo una interpolación en la curva patrón del azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración (Carrillo, 2016, p. 1).

El método DNS determina la presencia de grupos carbónicos libres ( $C=O$ ) de los azúcares reductores. El procedimiento se basa en una reacción redox, que ocurre en la utilización de

ácido 3,5 dinitrosalicílico para provocar la oxidación de los azúcares y al mismo tiempo su propia reducción endotérmica (Carrillo, 2016, p. 1).

Una mol de azúcar reacciona con una mol de ácido 3,5 dinitrosalicílico, dando lugar a una reacción estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. Después de esto se continúa con la determinación, haciendo lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm (Carrillo, 2016, p. 1).

#### **2.2.4. Espectrofotometría**

La espectrofotometría es uno de los métodos de análisis más usados, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración (Neira, 2010, p. 1).

Cuando incide una luz monocromática sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida, como consecuencia de la intensidad del rayo de luz sea atenuada desde  $P_o$  a  $P$ , siendo  $P_o$  la intensidad de la luz incidente y  $P$  la intensidad del rayo de luz transmitido (Neira, 2010, p. 1).

Dependiendo del compuesto y el tipo de absorción a medir, la muestra puede estar en fase líquida, sólida o gaseosa. En las regiones visibles y ultravioleta del espectro electromagnético, la muestra es generalmente disuelta para formar una solución (Neira, 2010, p. 1).

#### **2.2.5. Espectrofotómetro de microplacas Epoch™**

El Espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ de BioTek, está diseñado para una gran variedad de aplicaciones, como cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas y ensayos celulares (Biotek Instruments, 2017, p. 1).

El Epoch™ provee de mediciones espectrales en el rango UV-Visible de calidad. El sistema óptico de este espectrofotómetro incorpora un monocromador de alta precisión como selector de longitudes de onda, evitando así el uso de filtros de interferencia. Ensayos que usan microplacas de 6- pozos hasta 384- pozos, son ejecutados vía el software Gen5™ (Biotek Instruments, 2017, p. 1).

Cuando se requiere trabajar con muestras en donde el volumen es crítico, las placas opcionales para Micro-Volúmenes Take3™, permiten realizar mediciones de hasta dieciséis o cuarenta y ocho muestras de 2  $\mu$ L, de manera rápida y sencilla en el Epoch (Biotek Instruments, 2017, p. 1).

#### Características:

- Monocromador como selector de longitudes de onda desde 200 a 999 nm, en incrementos de 1 nm.
- Capacidad de lectura de microplacas de 6- a 384- pozos.
- Corrección de longitud de paso automatizada, para cuantificaciones directas sin necesidad de dilución.
- Análisis espectral, punto final, cinético, o análisis de área de pozo
- Software para Análisis de Datos Gen5™ incluido.
- Detector y electrónica integradas para mediciones con bajo ruido de fondo.
- Lámpara de Xenón Flash para toda la vida del instrumento.
- Diseño robusto para longevidad, incluso en uso pesado.
- Compatible con Placas Micro-Volumen Take3™, para mediciones de volúmenes bajos (2 µL), BioCell™ o cubetas estándar.
- Disponible en modelo opcional Epoch compatible con BioStack y sistemas automatizados de terceros.
- Disponible en modelo opcional Epoch compatible con BioStack™ y sistemas automatizados de terceros (Biotek Instruments, 2017, p. 1).



**Figura 1-2:** Espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ de BioTek.

**Fuente:** (Biotek Instruments, 2017, p. 1).

#### ***2.2.6. Fermentación sumergida***

Es un proceso que involucra el desarrollo de microorganismos en un medio de cultivo líquido. Este medio de cultivo contiene nutrientes y da como resultado la producción de enzimas industriales, antibióticos y otros productos (Essays UK, 2017, p. 1).

El proceso implica tomar un microorganismo específico, como hongos, y colocarlo en un pequeño frasco cerrado que contiene el caldo rico en nutrientes. También se requiere un alto volumen de oxígeno para el proceso. La producción de enzimas se produce cuando los hongos interactúan con los nutrientes en el caldo y los descomponen (Essays UK, 2017, p. 1).

A nivel industrial, por ejemplo, la producción de levaduras se ha convertido en un progreso importante para las industrias microbiológicas como resultado de la mejora de las tecnologías de fermentación (Essays UK, 2017, p. 1).

El proceso de fermentación sumergida es preferido para la producción de enzimas por la mejor disponibilidad de nutrientes, suficiente suplemento de oxígeno y menor tiempo requerido para la fermentación con relación a otras técnicas de fermentación (Gomes & Stiener, 1994, p. 11).



**Figura 2-2:** Fermentación sumergida de xilano.

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

### **2.2.7. Inhibidores enzimáticos**

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a enzimas e interfieren con las reacciones que catalizan de una forma reversible o irreversibles. Prácticamente todas las funciones de la célula requieren directa o indirectamente la presencia de enzimas para que ocurran a una velocidad adecuada las reacciones químicas que en definitiva son las responsables de esas funciones (Collado, 2014).

Su estudio resulta de gran utilidad a la hora de comprender los mecanismos de catálisis, la especificidad de los enzimas y otros aspectos de la actividad enzimática (Porto, 2012).

### **2.2.8. Lignocelulosa**

La lignocelulosa es el principal y más abundante componente de la biomasa renovable producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas, et al., 2006, p. 485).

La siguiente tabla resume los diferentes residuos lignocelulósicos con su respectiva composición:

**Tabla 2-2:** Contenido porcentual (%) de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos.

<b>Material lignocelulósico</b>	<b>Celulosa</b>	<b>Hemicelulosa</b>	<b>Lignina</b>
<b>Madera dura</b>	40-55	24-40	18-25
<b>Madera suave</b>	45-50	25-35	25-35
<b>Cáscara de nuez</b>	25-30	25-30	30-40
<b>Olote de maíz</b>	45	35	15
<b>Desechos de pastos</b>	25-40	35-40	18-30
<b>Papel</b>	85-99	0	0-15
<b>Paja de trigo</b>	30	50	15
<b>Hojas</b>	15-20	80-85	0
<b>Algodón</b>	80-95	0	0
<b>Papel periódico</b>	40-55	25-40	18-30
<b>Desecho de papel de pulpeo químico</b>	60-70	10-20	5-10
<b>Desechos sólidos de aguas residuales</b>	8-15	ND	24-29
<b>Desechos animales (cerdos)</b>	6	28	ND
<b>Desechos sólidos de ganado</b>	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
<b>Hierba Bermuda</b>	25	35,7	64
<b>Pastos de crecimiento rápido</b>	45	31,4	12

Fuente: (Sun & Yiajang, 2002, p. 2)

ND = No Disponible.

### **2.2.9. Medio de cultivo**

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias (Lopez & Torres, 2006, p. 1).

#### **2.2.10. Medio Luria- Bertani (LB)**

El medio Luria-Bertani (LB), es uno de los más usados para el cultivo de *Escherichia coli* y de otras especies bacterianas, debido a que es rico en nutrientes, que permite el crecimiento de una gran variedad de cepas. Está constituido por tres componentes, de los cuales uno es mineral, el cloruro de sodio, y dos son orgánicos: la triptona (o peptona) y el extracto de levadura. (Bertani, 1995, p. 293).

#### **2.2.11. Medio mínimo de sales (MSM)**

Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de microorganismos de preferencia acidofílicos caracterizado por no contener elementos traza. Está constituido por las siguientes proporciones: fuente de carbono 1 g, nitrato de sodio 0.1 g fosfato ácido de potasio 0.1 g, cloruro de potasio 0.1 g, sulfato de magnesio 0.05 g y extracto de levadura 0.05 g en 100 mL (Prasad & Qin, 2015, p. 1188).

#### **2.2.12. Producción de etanol de segunda generación**

Brasil es uno de los países pioneros en la producción y uso de bioetanol como combustible para automotores. El bioetanol de primera generación es aquel que se obtiene de procesos tecnológicos tradicionales a partir de cultivos de caña de azúcar, almidón o remolacha azucarera.

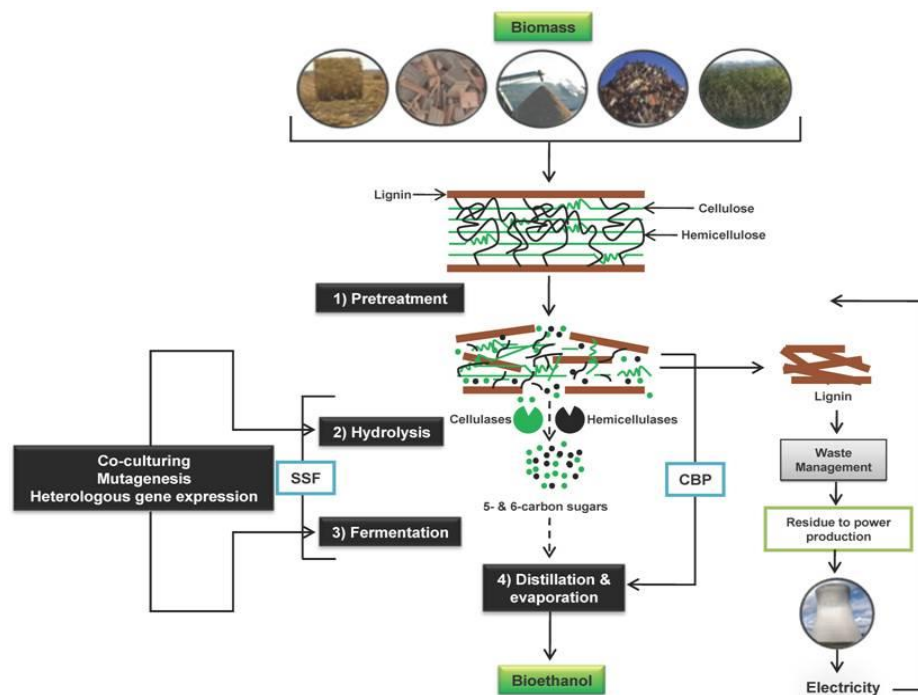
La producción de etanol de segunda generación (2G) comienza como alternativa a los procesos tradicionales, que depende de mejoras tanto en procesos tecnológicos y de innovación en lo que concierne al material de partida para lograr avances significativos en la eficiencia. Si tienen éxito, estos avances, combinados con las ventajas de costos relativos de Brasil y el amplio terreno cultivable, tienen el potencial de transformar radicalmente el papel del país en el mercado mundial de etanol.

La principal diferencia entre el etanol 1G y 2G está en el proceso de producción. El proceso de primera generación convierte los azúcares naturales de cultivos tales como la caña de azúcar, maíz y remolacha azucarera en etanol. En el etanol 2G, la producción no tiene un insumo definido, puede fabricarse a partir de una amplia gama de biomasas lignocelulósicas ricas en celulosa y hemicelulosa.

Sin embargo, algunos materiales son más eficientes en rendimiento y potencialmente más rentables que otros. En general, el proceso 2G es más ecológico que el 1G, aprovecha más la planta y tiene índices de conversión más elevados. Esto se traduce en menos residuos.

Los aumentos de la eficiencia resultantes del uso de los residuos son considerables: La misma área plantada puede generar hasta un 50% más de combustibles. Un punto clave es que el etanol 2G es exactamente el mismo que el etanol 1G, sin diferencias en el uso o la producción de energía. Sin embargo, la producción de etanol 1G es un 30% más cara (Aziakou, et al., 2017, p. 1).

El proceso de producción 2G también representa un mayor potencial de beneficio y está detallado en la figura 3-2. En la actualidad, un lote de enzimas sólo puede ser utilizado una vez. La industria está trabajando en la creación de enzimas que puedan ser reutilizadas durante varios ciclos de producción. Esto implica una reducción en el precio y mejoraría la competitividad con combustibles fósiles (Aziakou, et al., 2017, p. 1).



**Figura 3-2:** Representación esquemática para la conversión de biomasa lignocelulósica en bioetanol

**Fuente:** (Dashtban, et al., 2009, p. 589)

El esquema previo incluye los pasos más importantes en la producción de bioetanol 2G. La principal diferencia entre varias técnicas radica en la ejecución de la hidrólisis y fermentación; estos procesos pueden llevarse a cabo por separado, separate hydrolysis and fermentation (SHF) o simultáneamente, simultaneous saccharification and fermentation (SSF). Sin embargo, para un



bioproceso consolidado, consolidated bioprocess (CBP) todos los pasos de bioconversión son minimizados a un paso en un biorreactor simple utilizando uno o más microorganismos. (Dashtban, et al., 2009, p. 589)

Dentro de este contexto cabe mencionar la aplicación de xilanasas en la industria del bioetanol de segunda generación puede incrementar su efectividad porque aprovecha la hemicelulosa de los residuos, convirtiéndola en xilosa, la cual es un azúcar fermentable análogo a la glucosa.

### **2.2.13. Surfactantes**

Los surfactantes son agentes químicos "activos en superficie" (su nombre es un acrónimo inglés: "surfactant", de surface, superficie; active, activo, y -ant, -ante); cuando los surfactantes se disuelven en agua se concentran en interfases, como agua-aire o agua-aceite, y ahí ejercen diversas funciones: humedecen, emulsifican, dispersan y solubilizan; favorecen o impiden la formación de espuma; son antiestáticos y lubricantes; también dan brillo y afectan a ciertas propiedades reológicas (Carrero & Herráez, 2015, p. 1).

La adición de surfactantes al medio de cultivo ejerce diferentes efectos en la secreción de enzimas, dependiendo del grado en el que afecta la permeabilidad de las membranas celulares (Maheswar & Satyanarayana, 2003, p. 195).

Los detergentes utilizados en los laboratorios biomédicos son surfactantes y están compuestos por una cadena hidrocarbonada hidrofóbica y un grupo hidrofílico con carga en un extremo. Cuando se disuelven en agua, a una determinada temperatura y concentración, las moléculas de detergente forman micelas, con su porción hidrofóbica en el interior de la micela y el grupo cargado en el exterior (Labome, 2013, p. 3).

El largo de la región hidrofóbica es directamente proporcional al grado de hidrofobicidad y es bastante constante entre los detergentes. La concentración de detergente mínima a la cual se forman micelas a una temperatura dada es llamada concentración micelar crítica (CMC). Los detergentes más comunes se categorizan, según sus características, en tres tipos: iónicos (aniónicos o catiónicos), zwitteriónicos y no iónicos (Labome, 2013, p. 3).

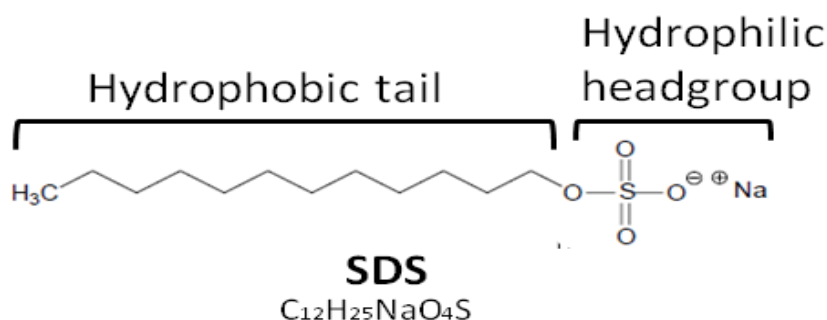
#### **2.2.13.1. Surfactantes iónicos**

Los detergentes iónicos se componen de una cadena hidrofóbica y un grupo terminal cargado, el cual puede ser un catión o un anión. Generalmente tienen valores de CMC mayores que los

detergentes no iónicos. Estos detergentes son fuertes. Los detergentes iónicos no pueden ser removidos por cromatografía de intercambio iónico debido a que poseen un grupo terminal cargado. (Labome, 2013, p. 3).

#### 2.2.13.1.1. Dodecil sulfato de sodio

El detergente aniónico SDS es un surfactante muy efectivo para solubilizar prácticamente todas las proteínas. El SDS se une a las proteínas en una relación 1,4 a 1 p/p (o un anión de SDS por cada dos aminoácidos). El SDS le agrega carga negativa a todas las proteínas de una muestra, al margen de su punto isoeléctrico. Esa es la principal razón por la cual se utiliza ampliamente en la electroforesis de geles de poliacrilamida con SDS (del inglés, SDS-PAGE). Para lisis completamente las células en presencia de SDS, generalmente hay que sonicar la muestra o pasarla por una aguja (19G) varias veces para asegurar la degradación del ADN (Suzuki & Terada, 1988, p. 260).



**Figura 4-2:** Estructura y fórmula del surfactante dodecil sulfato de sodio

**Fuente:** (Labome, 2013, p. 4).

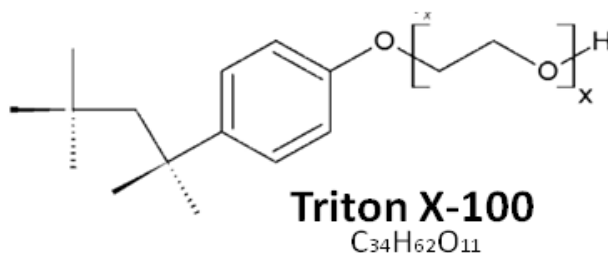
#### 2.2.13.2. Surfactantes no iónicos

Los detergentes no iónicos tienen grupos terminales hidrofílicos no cargados. Se los considera surfactantes intermedios ya que rompen las interacciones entre lípidos y proteínas y entre lípidos, pero no entre proteínas, y en general, no desnaturalizan las proteínas. Por ende, las proteínas son solubilizadas y aisladas en su estado nativo y activas. Son preferidos para la purificación de proteínas de membrana. (Labome, 2013, p. 5).

##### 2.2.13.2.2. Familia del Tritón

El Triton X-100 es un surfactante no iónico típico y el surfactante de elección para la mayoría de los experimentos de inmunoprecipitación. Todos los miembros de esta familia (Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P40 [7], Igepal® CA-630) son bastante similares y difieren solo en el número promedio de monómeros por micela (9,6; 8,9; 9,0 y 9,5 respectivamente) y en la distribución del tamaño de los grupos terminales de polietilenglicol (Arnold & Linke, 2007, p. 428).

El Triton X-100 deriva de polioxietileno y contiene un grupo hidrofóbico alquilfenil. Su valor de CMC es bajo y por ende no puede ser removido fácilmente por diálisis (Labome, 2013, p. 5).

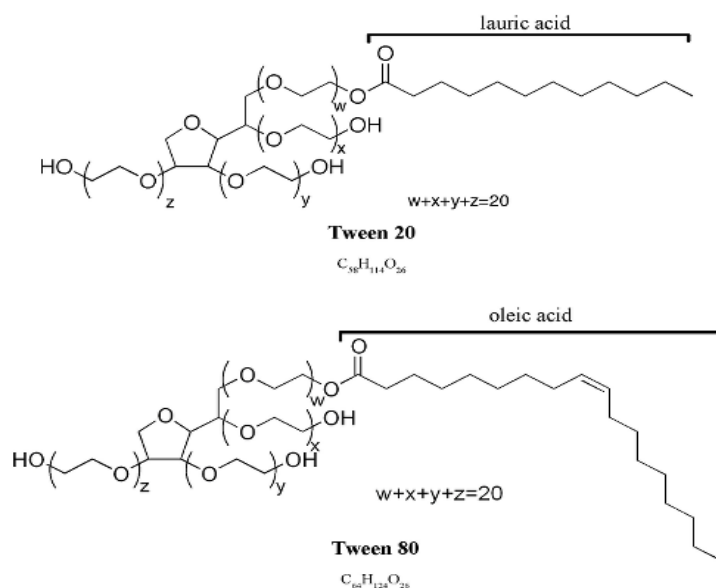


**Figura 5-2:** Estructura y fórmula del surfactante Triton X-100

**Fuente:** (Labome, 2013, p. 4).

#### 2.2.13.2.3. Familia del polisorbato o Tween

El Tween-20 y el Tween-80 son surfactantes polisorbatos con un ácido graso y una cadena de polioxietileno larga. Tienen una CMC muy baja y generalmente son surfactantes suaves, no afectan la actividad de la proteína y son efectivos en su solubilización. No son ingredientes comunes de los búferes de lisis de células. La diferencia entre los dos surfactantes mencionados es que el Tween-20 tiene ácido láurico, mientras que el Tween-80 tiene ácido oleico (Labome, 2013, p. 5).



**Figura 6-2:** Estructura y fórmulas de los surfactantes Tween-20 y Tween-80

**Fuente:** (Labome, 2013, p.4).

#### 2.2.13.3. Surfactantes zwitteriónicos

Los grupos terminales de los detergentes zwitteriónicos o anfotéricos son hidrofílicos y contienen el mismo número de cargas positivas que de negativas, lo que resulta en una carga neta nula. Son más fuertes que los surfactantes no iónicos. Un detergente zwitteriónico típico es el 3- [(3-colamidopropil) dimetilamonio] -1-propano sulfonato, mejor conocido como CHAPS. Su CMC (6 mM a temperatura ambiente) permite su remoción eficiente por diálisis. Es muy común en la preparación de muestras para isoelectroenfoque y electroforesis 2D en una concentración de 2 a 4 % (Labome, 2013, p. 5).

#### 2.2.13.4. Elección de surfactantes

El surfactante correcto debe ser capaz de lisar las células, solubilizar las proteínas y ser adecuado para las aplicaciones subsiguientes. Además, se debe considerar que la proteína solubilizada es requerida en su estado nativo o desnaturalizado. No existe un detergente ideal para todas las aplicaciones e inclusive en la misma aplicación el resultado es variable (Labome, 2013, p. 5).

Por ende, la mejor estrategia es la de prueba y error, y el uso de una mezcla de detergentes también debe ser evaluado. Además, la utilización de soluciones de detergentes recién preparadas es, en general, una buena práctica para evitar la hidrólisis y la oxidación (Labome, 2013, p. 5).

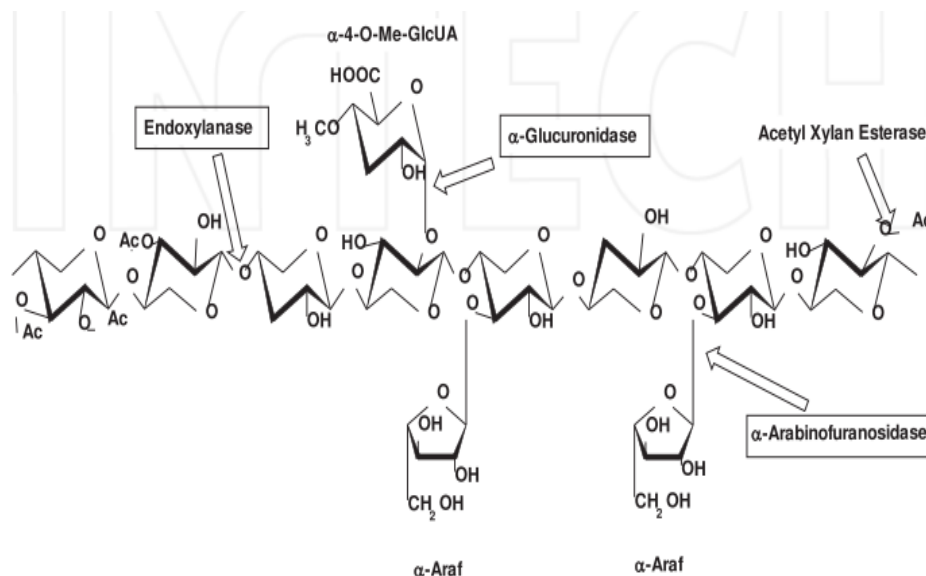
#### **2.2.14. Xilanasa**

Debido a la heterogeneidad del xilano su hidrólisis requiere de la acción de un sistema complejo de enzimas, comprendiendo la interacción de enzimas que ataquen la cadena principal con las que desprenden los grupos laterales unidos a los residuos de xilosa (Usui, et al., 1999, p. 1346).

El sistema enzimático que actúa en la hidrólisis del xilano está formado por endoxilanasas (endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, E.C.3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidasas (xilano-1,4- $\beta$ -xilosidasas, E.C.3.2.1.37),  $\alpha$ -glucuronidasas ( $\alpha$ -glucosiduronasas, E.C.3.2.1.139),  $\alpha$ -arabinofuranosidasas ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, E.C.3.2.1.55) y acetilxilano esterasas (E.C.3.1.1.72) (Juturu & Wu, 2011, p. 10).

Entre todas las xilanasas, las endoxilanasas son las más importantes debido a su involucramiento directo en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos y liberando xilooligosacáridos de cadena corta (Verma & Satyanarayana, 2012, p. 260).

La enzima endo xilanasas cataliza la hidrólisis aleatoria del xilano a xilooligosacáridos, mientras  $\beta$ -xilosidasas libera los residuos de xilosa de los extremos no reductores de xilooligosacáridos. Sin embargo, una completa degradación requiere la acción sinérgica de la enzima acetil esterasa para remover los sustituyentes acetílicos de la cadena principal de D-xilosa con enlaces  $\beta$ -1,4 de xilano (Wong, et al., 1988, p. 17).



**Figura 7-2:** Estructura del xilano y las enzimas xilanolíticas involucradas en su degradación. Ac: Grupo acetilo;  $\alpha$ -Araf:  $\alpha$ -arabinofuranosa;  $\alpha$ -4-O-Me-GlcA:  $\alpha$ -4-O- ácido metilglucurónico.

**Fuente:** (Sunna & Antranikian, 1997, p. 60).

### 2.2.15. Xilano

El xilano es el polisacárido hemicelulósico más abundante en paredes celulares de plantas representando hasta 30% – 35% del total de peso seco (Joseleau, et al., 1992, p. 1).

El xilano está constituido por una cadena principal de  $\beta$ -(1-4)-xilopiranosas (xilosa; peso molecular 150 g/mol); el arabinoxilano tiene residuos de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa (L-arabinosa) y de ácido glucurónico en posición C(O)-2 y/o C(O)-3 sobre la estructura del xilano, aunque también puede estar sustituido con glucosa o galactosa y estar esterificados con ácidos ferúlicos, diferúlicos y p-cumáricos en posición C(O)-5 de la arabinosa (Dornez, et al., 2009, p. 496).

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Hipótesis y especificación de variables

##### 3.1.1. *Hipótesis general*

La optimización de la producción de xilanasa bacteriana a partir de *Bacillus sp. K1* permitirá la reutilización de residuos lignocelulósicos industriales de bajo valor económico como sustrato mediante la técnica de fermentación sumergida.

##### 3.1.2. *Hipótesis específicas*

- La fermentación sumergida del xilano purificado de espelta y avena por acción de *Bacillus sp. K1* permitirá el análisis de su curva de crecimiento y su relación con la producción periódica de xilanasa.
- Mediante la variación del pH, temperatura y volumen de inóculo en el cultivo de *Bacillus sp. K1* se determinará las condiciones físicas óptimas de su cultivo.
- La utilización de los residuos lignocelulósicos y azúcares purificadas como sustrato para la producción de xilanasa bacteriana por la cepa *Bacillus sp. K1* permitirá determinar la fuente óptima de carbono en comparación con el uso de xilano purificado de espelta y avena.
- La evaluación de diferentes fuentes inorgánicas y orgánicas de nitrógeno en el cultivo de la cepa *Bacillus sp. K1* permitirá identificar su efecto sobre la actividad enzimática de la xilanasa bacteriana producida.
- El análisis de las relaciones entre la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas en el cultivo de *Bacillus sp. K1* permitirá determinar la más favorable para la producción de xilanasa bacteriana con mayor actividad enzimática.

- La adición de diferentes iones metálicos (sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso, níqueloso, cúprico, cobaltoso y manganeso) y surfactantes (Polisorbato-20, dodecil sulfato de sodio y Triton X-100) en el medio de cultivo de la cepa *Bacillus sp. K1* influirá en la actividad enzimática de la xilanasa bacteriana producida.

### **3.1.3. Identificación de variables**

#### **3.1.3.1. Variables independientes:**

- Tiempo de incubación
- Temperatura
- pH
- Volumen de inóculo
- Naturaleza de la fuente de carbono
- Concentración de la fuente de carbono
- Naturaleza de la fuente inorgánica de nitrógeno
- Concentración de la fuente inorgánica de nitrógeno
- Naturaleza de la fuente orgánica de nitrógeno
- Relación entre la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno
- Naturaleza de iones metálicos añadidos
- Naturaleza de surfactantes añadidos



*3.1.3.4. Variables dependientes:*

- Actividad enzimática
- Densidad Óptica a 600 nm

### 3.1.4. Operacionalización de variables

**Tabla 1-3:** Operacionalización de variables.

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	RANGO	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN
Tiempo de incubación	Período de tiempo de fermentación	Horas	0-144	Temporizador
pH	Unidad de medida de alcalinidad o acidez de una solución.	--	4-9	pHmetro
Temperatura	Es una medida de la energía cinética promedio de las partículas que constituyen un cuerpo.	Celsius	25-50	Termómetro
Volumen del inóculo	Porcentaje de cultivo bacteriano incluido en la fermentación sumergida del xilano.	% v/v	0,5-10	Micropipeta volumétrica
Naturaleza de la fuente de Carbono	Se analizará el efecto de 5 residuos lignocelulósicos (salvado de trigo, paja de trigo, aserrín, rastrojo de maíz y hojas de olmo de roca) y 5 azúcares purificadas (lactosa, sacarosa, D-sorbitol, D- Fructosa, D- Glucosa) al 1%	--	--	Balanza electrónica
Concentración de la fuente de carbono	Diferentes porcentajes de la fuente de carbono óptima previamente identificada	% m/v	0,5-5	Balanza electrónica
Naturaleza de la fuente inorgánica de nitrógeno	5 sustancias (sulfato de amonio, nitrato de potasio, cloruro de amonio, nitrato de sodio y citrato de amonio) a 1% m/v.	--	--	Balanza electrónica

Concentración de la fuente inorgánica de nitrógeno	Diferentes porcentajes de la fuente de nitrógeno inorgánica óptima previamente identificada.	% m/v	0,5-5	Balanza electrónica
Naturaleza de la fuente orgánica de nitrógeno	5 sustancias (extracto de levadura, peptona, urea, extracto de malta y triptona) a 1% m/v.	--	--	Balanza electrónica
Relación entre la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno	Diferentes relaciones entre los porcentajes de las fuentes de carbono de nitrógeno inorgánico y orgánico manteniendo constante los porcentajes previamente optimizados.	--	--	Balanza electrónica
Naturaleza de los iones metálicos añadidos.	Adición de 9 iones metálicos (sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso, níqueloso, cúprico, cobaltoso y manganoso) en concentración 1 mM.	--	--	Balanza electrónica
Naturaleza de los surfactantes añadidos.	Adición de 3 surfactantes (Polisorbato-20, dodecil sulfato de sodio y Triton X-100) en concentración 1%.	--	--	Balanza electrónica
Densidad Óptica a 600 nm	El uso de la espectrofotometría para medir la densidad óptica a 600 nm (OD600) de un cultivo bacteriano con la finalidad monitorear el crecimiento.	Absorbancia en función de las variables independientes según sea el caso.	--	Espectrofotómetro de microplacas
Actividad enzimática	Es una propiedad que se define como la medida de la tasa de conversión de una reacción química específica, que la enzima cataliza en un sistema de ensayo específico	Concentración ( $\mu\text{mol/Lmin}$ ) en función de las variables independientes según sea el caso.	--	Espectrofotómetro de microplacas

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

### 3.1.5. Matriz de consistencia

**Tabla 2-3:** Matriz de consistencia.

PROBLEMA GENERAL		OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	
El presente estudio se enfoca en el análisis de la producción de xilanasa bacteriana por la cepa <i>Bacillus sp. K1</i> , la cual ha sido previamente aislada de muestras de madera en estado de putrefacción en las premisas de la Universidad de Lakehead para el laboratorio de Biotecnología para Enzimas, Bioproductos y Biocombustibles de la Universidad citada (Prasad & Qin, 2015). Seguido de la optimización de los parámetros involucrados en la producción de xilanasa, utilizando como sustrato diferentes residuos lignocelulósicos para el cultivo de la cepa bacteriana.		Optimizar la producción de xilanasa bacteriana a partir de <i>Bacillus sp. K1</i> utilizando residuos lignocelulósicos en el Departamento de Biología de la Universidad de Lakehead, Canadá.	La optimización de la producción de xilanasa bacteriana a partir de <i>Bacillus sp. K1</i> permitirá la reutilización de residuos lignocelulósicos industriales de bajo valor económico como sustrato mediante la técnica de fermentación sumergida.	
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES	MÉTODOS DE ANÁLISIS
Se desconoce si la cepa <i>Bacillus sp. K1</i> produce	Verificar la producción de xilanasa bacteriana por parte de la cepa <i>Bacillus sp. K1</i>	La fermentación sumergida del xilano purificado de espelta y avena por acción	<ul style="list-style-type: none"> <li>Independiente: Tiempo de incubación.</li> <li>Dependientes:</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Espectrofotometría de microplaca.</li> <li>Ensayo de Miller</li> </ul>

xilanasa (endo-1,4- $\beta$ -xilanasa, E.C.3.2.1.8).	mediante el análisis de su actividad enzimática en función del tiempo de incubación.	de <i>Bacillus sp. K1</i> permitirá el análisis de su curva de crecimiento y su relación con la producción periódica de xilanasa.	OD 600 en función del tiempo de incubación  Actividad enzimática en función del tiempo de incubación.	
Se desconoce los parámetros físicos óptimos asociados con la producción de xilanasa	Determinar las condiciones óptimas (pH, temperatura y volumen del inóculo) para el cultivo de la cepa <i>Bacillus sp. K1</i> en xilano purificado de espelta y avena.	Mediante la variación del pH, temperatura y volumen de inóculo en el cultivo de <i>Bacillus sp. K1</i> se determinará las condiciones físicas óptimas de su cultivo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Independientes: Temperatura, pH y volumen de inóculo.</li> <li>Dependientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>OD 600 en función de las variables independientes especificadas</li> <li>Actividad enzimática en función de las variables independientes especificadas.</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Espectrofotometría de microplaca.</li> <li>Ensayo de Miller</li> </ul>
La producción de xilanasa bacteriana con xilano	Comparar el efecto de cinco tipos de residuos lignocelulósicos y cinco	La utilización de los residuos lignocelulósicos y azúcares purificadas como	<ul style="list-style-type: none"> <li>Independientes: Naturaleza de la fuente de carbono y concentración de la</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ensayo de Miller</li> </ul>

purificado como sustrato no es un proceso económicamente viable.	azúcares purificadas con el uso de xilano purificado de avena y espelta, como sustrato para el cultivo de la cepa <i>Bacillus sp. K1</i> , en la actividad enzimática de la xilanasa bacteriana producida.	sustrato para la producción de xilanasa bacteriana por la cepa <i>Bacillus sp. K1</i> permitirá determinar la fuente óptima de carbono en comparación con el uso de xilano purificado de espelta y avena.	fuelle de carbono.  • Dependientes: Actividad enzimática en función de las variables independientes especificadas.	
Se desconoce los tipos y concentraciones óptimas de las fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico.	Evaluar el efecto de cinco fuentes orgánicas de nitrógeno y cinco inorgánicas diferentes, para el cultivo de la cepa <i>Bacillus sp. K1</i> , en la actividad enzimática de la xilanasa bacteriana producida.	La evaluación de diferentes fuentes inorgánicas y orgánicas de nitrógeno en el cultivo de la cepa <i>Bacillus sp. K1</i> permitirá identificar su efecto sobre la actividad enzimática de la xilanasa bacteriana producida.	• Independientes: Naturaleza de la fuente de nitrógeno inorgánico, concentración de la fuente de nitrógeno inorgánico, naturaleza de la fuente de nitrógeno orgánico.  • Dependientes: Actividad enzimática en función de las variables independientes especificadas.	• Ensayo de Miller
La relación óptima entre la concentración de la	Determinar la relación óptima entre la fuente de carbono y la fuente de	El análisis de las relaciones entre la concentración de las fuentes de carbono y	• Independientes: Relación entre la concentración de las fuentes de carbono y	• Ensayo de Miller

fuelle de nitrógeno orgánico con la de inorgánico y carbono es desconocida.	nitrógeno a utilizar en cultivo de la cepa <i>Bacillus sp. K1</i> .	nitrógeno utilizadas en el cultivo de <i>Bacillus sp. K1</i> permitirá determinar la más favorable para la producción de xilanas bacteriana con mayor actividad enzimática.	nitrógeno <ul style="list-style-type: none"> <li>Dependientes:</li> </ul> Actividad enzimática en función de la variable independiente especificada.	
Se desconoce el efecto que tiene la adición de diferentes iones metálicos y surfactantes en la producción de xilanas	Identificar el efecto de los iones metálicos (sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso, níqueloso, cúprico, cobaltoso y manganeso) y los surfactantes (Polisorbato-20, dodecil sulfato de sodio y Triton X-100) en la actividad enzimática de la xilanas bacteriana producida.	La adición de diferentes iones metálicos (sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso y níqueloso) y surfactantes (Polisorbato-20, dodecil sulfato de sodio y Triton X-100) en el medio de cultivo de la cepa <i>Bacillus sp. K1</i> influirá en la actividad enzimática de la xilanas bacteriana producida.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Independientes:</li> </ul> Naturaleza de iones metálicos y surfactantes añadidos. <ul style="list-style-type: none"> <li>Dependientes:</li> </ul> Actividad enzimática en función de las variables independientes especificadas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ensayo de Miller</li> </ul>

Realizado por: Terry Solis, 2018.

### 3.2. Tipo y diseño de la investigación

La presente investigación es:

**Exploratoria:** Su carácter es exploratorio debido a que el investigador detecta variables, relaciones y condiciones en las que se da el fenómeno en el que está interesado, que en el presente caso es la producción de xilanas bacteriana.

**Descriptiva:** Se considera una investigación descriptiva porque trata de describir las características más importantes de un determinado objeto de estudio con respecto a su aparición y comportamiento, es decir el efecto que tienen diferentes variables en la producción de xilanas bacteriana.

Además, el diseño será de tipo experimental con la siguiente metodología general:





### **3.3. Unidad de análisis**

La cepa bacteriana *Bacillus sp. K1*, responsable de la producción de xilanasas utilizada en el presente estudio, la cual fue aislada en las premisas de la Universidad de Lakehead, Thunder Bay, Ontario, Canadá; a partir de una muestra de madera en estado de putrefacción (Prasad & Qin, 2015, p. 1187) y preservada en refrigeración a -83 °C. La bacteria fue identificada previamente como productora de celulasa por Prasad & Qin, (2015, p. 1187)

### **3.4. Población de estudio**

Los cinco residuos lignocelulósicos (salvado de trigo, paja de trigo, aserrín, rastrojo de maíz y hojas de olmo de roca (*Ulmus thomasi Sarg.*)) y cinco azúcares purificadas (lactosa, sacarosa, D-sorbitol, D- Fructosa, D- Glucosa) que serán probados como posibles sustratos por parte de *Bacillus sp. K1* para la producción de xilanasas.

### **3.5. Tamaño de muestra**

1% de inóculo de *Bacillus sp. K1* activado en frascos Erlenmeyer que contendrán medios de cultivo a diferentes condiciones experimentales.

### **3.6. Selección de muestra**

La bacteria *Bacillus sp. K1* será cultivada previamente en cajas petri con medio de cultivo Luria-Bertani. Las colonias que no presenten contaminación serán utilizadas para su respectiva activación en medio líquido en frascos Erlenmeyer, el cual a su vez se utilizará en los experimentos de optimización. Se tomará una muestra representativa del medio de cultivo para realizar las pruebas de laboratorio por triplicado.

### **3.7. Técnicas de recolección de datos**

#### ***3.7.6. Cepa bacteriana y su activación***

La bacteria *Bacillus sp. K1* fue cultivada en una caja Petri con medio de cultivo LB (15 g/L agar, 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L cloruro de sodio). La caja Petri fue colocada en una incubadora a 37 °C por 24 h.

Para la activación de la bacteria a utilizarse en el estudio, se empleó 50 mL de con medio de cultivo Luria-Bertani (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L cloruro de sodio) en un matraz, para luego ser incubado por 15 h a 37 °C y 200 rpm de velocidad de agitación.

### ***3.7.7. Cultivo de la cepa bacteriana***

De acuerdo a Prasad & Qin, ( 2015, p. 1187) la cepa previamente activada fue cultivada (1% volumen de inóculo) en un medio de sales minerales (MSM) en las siguientes proporciones: xilano de purificado de espelta y avena 1 g, nitrato de sodio 0.1 g, fosfato ácido de potasio, 0.1 g, cloruro de potasio 0.1 g, sulfato de magnesio 0.05 g y extracto de levadura 0.05 g en 100 mL. En la presente investigación se reemplazó la fuente original de carbono (Carboximetilcelulosa) con xilano purificado de espelta y avena con la finalidad de alcanzar los objetivos planteados.

Adicionalmente, el pH fue ajustado en 7 utilizando soluciones de hidróxido de sodio o ácido clorhídrico según la acidez o basicidad del medio. El experimento fue desarrollado por triplicado en matraces con 20 mL de medio de cultivo de sales minerales (MSM) con un previo proceso de autoclavado por 45 minutos con enfriamiento lento. Las condiciones experimentales de fermentación fueron de 37 °C y 200 rpm de velocidad de agitación por 144 h. Las muestras fueron tomadas cada 12 h.

### ***3.7.8. Densidad óptica y medición de la actividad enzimática***

#### ***3.7.8.1. Construcción de la curva de calibración***

La actividad de la enzima se determinó midiendo la liberación de azúcares reductores durante la reacción enzima-sustrato usando el reactivo, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959, p. 428).

Este método requiere la construcción previa de una curva de calibración con xilosa. La longitud de onda utilizada fue de 540 nm. La curva de calibración se desarrolló utilizando diferentes soluciones de xilosa con una concentración en el rango de 0 µg / mL a 800 µg / mL. Se mezclaron 10 µL de cada dilución con 20 µL de solución buffer de sodio citrato / ácido cítrico (pH = 5,3).

A continuación, las muestras se mezclaron con 60 µL de reactivo DNS, se hirvieron durante 10 min y se diluyeron a 300 µL con agua destilada. Finalmente, la absorbancia se determinó con

200 µL a 540 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA). (Guo, et al., 2017, p. 195).

Los experimentos se realizaron por triplicado y la curva se construyó mediante la técnica de regresión lineal ejecutada con los datos de concentraciones de xilosa (variable independiente) y los promedios de sus correspondientes absorbancias (variable dependiente). El resultado será una recta de la forma:

$$y = mx + b \quad \textbf{Ecuación 1}$$

Donde:

Y = Absorbancia de la muestra.

X = Concentración de xilosa (µg/mL).

m = Pendiente de la recta.

b = Ordenada al origen.

La curva de calibración se aceptará si el coeficiente de correlación múltiple de la regresión es mayor a 0,99.

#### *3.7.8.2. Medición de la densidad óptica*

Se tomó muestras a partir del cultivo de la cepa bacteriana cada 12 h y se descongelaron lentamente con hielo. La densidad óptica de varias muestras se midió en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Vermont, EE. UU.), como una medida de la concentración de bacterias en una suspensión. Estos valores se usaron para trazar una curva de crecimiento bacteriano.

#### *3.7.8.3. Extracción de la enzima cruda*

Las muestras se centrifugaron a 12000 rev/min durante 3 min. El sobrenadante claro (extracto crudo) se utilizó para el ensayo enzimático.

#### *3.7.8.4. Ensayo de actividad enzimática para xilanasa*

La mezcla de reacción contenía 20 µL de solución de xilano purificado de avena y espelta al 1% (preparada en tampón citrato 0,05 M de pH 5,3) como sustrato, se incubaron 10 µL de extracto enzimático diluido y tampón de citrato (0,05 M, pH 5,3) a 50 °C durante 30 min y luego la reacción se terminó mediante la adición de 60 µL de reactivo DNS.

Se ejecutó un control simultáneamente que contenía todos los reactivos, pero la reacción se terminó antes de la adición del extracto de enzima. Las muestras se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 10 min y luego se enfriaron a temperatura ambiente y se diluyeron a 300 µL con agua destilada. La absorbancia de las muestras se determinó usando 200 µL en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Vermont, EE. UU.) a 540 nm (Guo, et al., 2017, p. 195).

Una unidad de actividad de xilanasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µmol de azúcar reductor equivalente a xilosa por litro minuto en las condiciones de ensayo especificadas (Miller, 1959, p. 428).

Los promedios de absorbancia obtenidos en cada ensayo fueron convertidos en concentración de xilosa (µg/mL) con el uso de la curva de calibración previamente realizada.

Posteriormente, la concentración de xilosa será transformada en unidad de actividad enzimática mediante la siguiente ecuación:

$$Ac_x = \frac{X * V_r * 1000}{t_{inc} * P_{xilosasa} * V_e} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$Ac_x$  = Actividad de xilanasa (µmol xilosa/ Lmin).

$X$  = Concentración de xilosa (µg/mL reacción).

$V_r$  = Volumen total de reacción (0,03 mL reacción).

$V_e$  = Volumen del extracto enzimático (0,01 mL extracto).

$t_{inc}$  = Tiempo de incubación (30 min).

$P_{xilosa}$  = Peso molecular de xilosa (150  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ).

### **3.7.9. Optimización de las condiciones de fermentación**

#### **3.7.9.1. Optimización del pH**

Se compararon diferentes pH en un rango de 3 a 9 en las condiciones de cultivo para verificar la actividad óptima de la xilanasa. Cada muestra se analizó a las 36 h, cuando la actividad de xilanasa era más alta, en base a los ensayos anteriores.

#### **3.7.9.2. Optimización del volumen de inóculo.**

Se compararon diferentes volúmenes de inóculo de 0.5% a 10% en las condiciones de cultivo para verificar la actividad óptima de la xilanasa. Cada muestra se analizó a las 36 h, cuando la actividad de xilanasa era más alta, en base a los ensayos anteriores.

#### **3.7.9.3. Optimización de la temperatura de fermentación.**

Se compararon diferentes temperaturas de 25 °C a 45 °C en las condiciones de cultivo para verificar la actividad óptima de la xilanasa. Cada muestra se analizó a las 36 h, cuando la actividad de xilanasa era más alta, en base a los ensayos anteriores.

### **3.7.10. Optimización del medio de fermentación**

#### **3.7.10.1. Optimización de la fuente de carbono**

Los residuos comparados con xilano de avena y espelta fueron: afrecho de trigo, paja de trigo, aserrín, rastrojo de maíz y hojas de olmo de roca (*Ulmus thomasi* Sarg.). Adicionalmente se probaron diferentes azúcares purificadas como fuente de carbono tales como: lactosa, sacarosa, D-sorbitol, D- Fructosa, D- Glucosa. Finalmente, se probó con diferentes concentraciones de la fuente de carbono optimizada en un rango de 0,5% a 5%.

#### **3.7.10.2. Optimización de la fuente de nitrógeno**

Las fuentes orgánicas de nitrógeno comparadas fueron: extracto de levadura, peptona, úrea, extracto de malta y triptona. A su vez las fuentes inorgánicas fueron: sulfato de amonio, nitrato de potasio, cloruro de amonio, nitrato de sodio y nitrato de amonio. Este experimento mantuvo

las condiciones de cultivo previamente optimizadas con 1% de fuente de nitrógeno. Finalmente, se probó con diferentes concentraciones de la fuente inorgánica de nitrógeno optimizada en un rango de 0,5% a 4%.

### *3.7.10.3. Relación entre la concentración fuente de nitrógeno/ carbono.*

Se utilizó la relación ya optimizada entre la fuente de carbono y nitrógeno inorgánica para ensayar diferentes relaciones de concentración con la fuente orgánica de nitrógeno (8:1:1, 8:1:2, 8:1:4, 8:1:5, 8:1:6, 8:1:8) en la preparación del medio de cultivo para verificar la actividad óptima de la xilanasa.

### *3.7.11. Efecto de iones metálicos y surfactantes*

Se ensayaron diferentes iones metálicos (sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso y níqueloso) con una concentración 1 mM y surfactantes (Polisorbato-20, dodecil sulfato de sodio y Triton X-100) con concentración 0,1% en el medio de cultivo y se determinó su efecto en la actividad de la enzima xilanasa se comparó manteniendo las condiciones previamente optimizadas.

### *3.7.12. Análisis estadístico*

Todos los experimentos de absorbancia se realizaron por triplicado y los promedios se obtuvieron de la siguiente manera:

$$A_{promedio} = \frac{A_1 + A_2 + A_3}{3} \quad \text{Ecuación 3}$$

Adicionalmente, las absorbancias promedio se restaron de la absorbancia de control:

$$A_{diferencia} = A_{promedio} - A_{control}$$

Los resultados finales se mostraron con una estimación de error equivalente a  $\pm$  Desviación estándar con un nivel de confianza del 95% calculada con la siguiente fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

$s$  = Desviación estándar

$x_i$  = Medida actual

$\bar{x}$  = Promedio de las medidas

$n$  = número de medidas realizadas

En los experimentos de optimización se graficaron las absorbancias relativas, calculadas como porcentaje en relación a la actividad enzimática de mayor valor.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Análisis de resultados

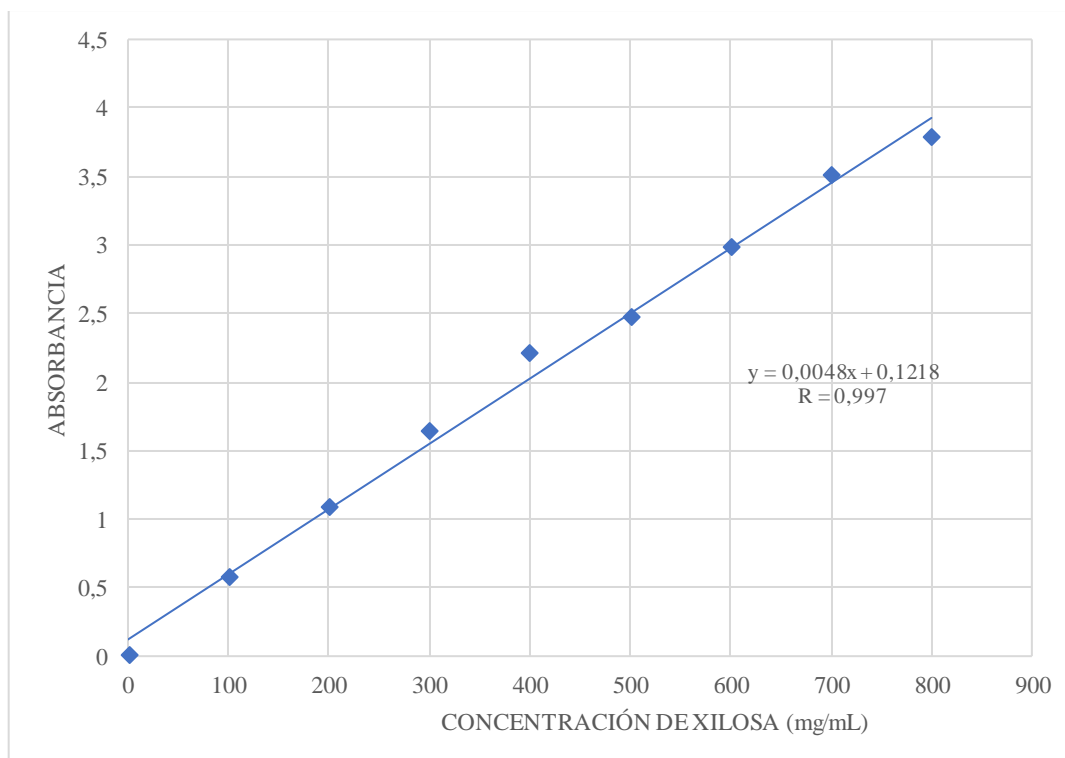
##### 4.1.1. Curva de calibración de xilosa

**Tabla 1-4:** Absorbancias (A) promedios y correspondientes diferencias con el experimento de control a distintas concentraciones de xilosa entre 0 y 1000 µg/mL.

Concentración de Xilosa	A promedio	A diferencia
<b>0 (Control)</b>	0,113	0
<b>100</b>	0,677	0,564
<b>200</b>	1,198	1,085
<b>300</b>	1,754	1,641
<b>400</b>	2,314	2,201
<b>500</b>	2,585	2,476
<b>600</b>	3,087	2,975
<b>700</b>	3,618	3,505
<b>800</b>	3,889	3,776

Realizado por: Terry Solis, 2018.





**Gráfico 1-4:** Curva de calibración de xilosa obtenida por regresión lineal

Realizado por: Terry Solis, 2018.

#### 4.1.2. Análisis periódico de la densidad óptica y producción de xilanas durante seis días de incubación.

**Tabla 2-4:** Densidad óptica (OD) de las muestras en función del tiempo de incubación en h.

Tiempo de incubación	OD promedio	OD diferencia	Desviación estándar
<b>0 (Control)</b>	0,091	0,000	0,000
<b>12</b>	0,998	0,907	0,115
<b>24</b>	0,903	0,813	0,160
<b>36</b>	0,840	0,749	0,242
<b>48</b>	0,944	0,853	0,220
<b>60</b>	0,977	0,887	0,185
<b>72</b>	0,886	0,795	0,210
<b>84</b>	1,007	0,916	0,137
<b>96</b>	0,923	0,832	0,079
<b>108</b>	0,873	0,782	0,045
<b>120</b>	0,915	0,824	0,102

<b>132</b>	0,802	0,711	0,144
<b>144</b>	0,829	0,739	0,056

Realizado por: Terry Solis, 2018.

**Tabla 3-4:** Actividad enzimática de xilanas (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función del tiempo de incubación en h.

Tiempo de incubación	A promedio	A diferencia	Actividad enzimática	Desviación estándar
<b>0 (Control)</b>	0,127	0,000	0,000	0,000
<b>12</b>	0,984	0,857	102,157	6,045
<b>24</b>	0,918	0,791	92,898	5,223
<b>36</b>	1,012	0,885	106,046	8,652
<b>48</b>	0,864	0,737	85,375	7,562
<b>60</b>	0,886	0,759	88,500	6,875
<b>72</b>	0,573	0,446	45,028	2,946
<b>84</b>	0,773	0,646	72,806	0,982
<b>96</b>	0,744	0,617	68,708	10,312
<b>108</b>	0,733	0,606	67,250	1,375
<b>120</b>	0,528	0,401	38,708	2,848
<b>132</b>	0,618	0,491	51,208	7,562
<b>144</b>	0,596	0,469	48,222	4,321

Realizado por: Terry Solis, 2018.

#### **4.1.3. Optimización de las condiciones de fermentación**

##### **4.1.3.1. Optimización del pH de fermentación**

El experimento consistió en variar el pH de fermentación y optimizarlo mediante el análisis de la densidad óptica y actividad enzimática relativa de muestras tomadas en el tiempo de fermentación previamente determinado, es decir 36 h

**Tabla 4-4:** Densidad óptica (OD) de las muestras en función del pH a 36 h de fermentación.

pH	OD promedio	OD diferencia	Desviación estándar
<b>Control</b>	0,098	0,000	0,008

<b>4</b>	0,774	0,676	0,067
<b>5</b>	0,736	0,638	0,130
<b>6</b>	0,917	0,820	0,046
<b>7</b>	0,516	0,419	0,048
<b>8</b>	0,582	0,484	0,082
<b>9</b>	0,762	0,664	0,083

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

**Tabla 5-4:** Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función del pH a 36 h de fermentación.

<b>pH</b>	<b>A promedio</b>	<b>A diferencia</b>	<b>Actividad enzimática</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>Control</b>	0,153	0,000	0,000	0,000
<b>4</b>	0,980	0,827	97,944	5,705
<b>5</b>	0,932	0,779	91,278	11,610
<b>6</b>	1,269	1,116	138,083	20,050
<b>7</b>	0,993	0,84	99,750	4,319
<b>8</b>	1,122	0,967	117,620	5,896
<b>9</b>	0,600	0,447	45,167	9,057

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

#### 4.1.3.2. Optimización del volumen de inóculo

El experimento consistió en variar el volumen de inóculo de la cepa activada (% v/v) y optimizarlo mediante el análisis de la densidad óptica y actividad enzimática relativa de muestras tomadas a 36 h de fermentación con un pH 6, previamente optimizado.

**Tabla 6-4:** Densidad óptica (OD) de las muestras en función del volumen de inóculo (% v/v).

<b>Volumen de Inóculo</b>	<b>OD promedio</b>	<b>OD diferencia</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>CONTROL</b>	0,098	0,000	0,000
<b>0,5</b>	1,013	0,916	0,045
<b>1</b>	1,070	0,972	0,032

<b>2,5</b>	1,095	0,998	0,032
<b>5</b>	1,057	0,960	0,059
<b>7,5</b>	1,114	1,016	0,005
<b>10</b>	1,164	1,066	0,026

Realizado por: Terry Solis, 2018.

**Tabla 7-4:** Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función del volumen de inóculo (% v/v).

Volumen de Inóculo	A promedio	A diferencia	Actividad enzimática	Desviación estándar
<b>CONTROL</b>	0,120	0,000	0,000	0
<b>0,5</b>	1,168	1,048	128,569	11,785
<b>1</b>	1,357	1,237	154,843	7,587
<b>2,5</b>	1,276	1,156	143,639	8,860
<b>5</b>	1,195	1,075	132,389	2,055
<b>7,5</b>	0,688	0,568	61,903	2,946
<b>10</b>	1,120	1,000	122,019	9,108

Realizado por: Terry Solis, 2018.

#### 4.1.3.3. Optimización de la temperatura de fermentación

El experimento consistió en variar la temperatura de fermentación (°C) y optimizarla mediante el análisis de la densidad óptica y actividad enzimática relativa de muestras tomadas a 36 h de fermentación con las condiciones previamente optimizadas de pH 6 y volumen de inóculo de 1% v/v.

**Tabla 8-4:** Densidad óptica (OD) de las muestras en función de la temperatura de fermentación (°C).

Temperatura de fermentación	OD promedio	OD diferencia	Desviación estándar
<b>Control</b>	0,102	0,000	0,000
<b>25</b>	1,201	1,099	0,110
<b>30</b>	0,916	0,814	0,010

<b>35</b>	0,829	0,727	0,165
<b>40</b>	1,123	1,022	0,010
<b>45</b>	1,005	0,904	0,040
<b>50</b>	0,976	0,874	0,040

Realizado por: Terry Solis, 2018.

**Tabla 9-4:** Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la temperatura de fermentación (°C).

<b>Temperatura de fermentación</b>	<b>A promedio</b>	<b>A diferencia</b>	<b>Actividad enzimática</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>Control</b>	0,102	0,000	0,000	0,000
<b>25</b>	1,300	1,198	149,519	3,928
<b>30</b>	0,919	0,817	96,556	2,161
<b>35</b>	1,366	1,264	158,685	5,486
<b>40</b>	0,972	0,870	103,917	1,637
<b>45</b>	1,012	0,911	109,565	5,426
<b>50</b>	0,584	0,483	50,120	1,807

Realizado por: Terry Solis, 2018.

#### ***4.1.4. Optimización de la fuente de carbono***

Los experimentos realizados tuvieron como finalidad determinar la naturaleza y concentración óptima de la fuente de carbono mediante el análisis de la actividad enzimática relativa de muestras tomadas a 36h de fermentación con las condiciones físicas previamente optimizadas de pH 6, volumen de inóculo de 1% v/v y temperatura de 35°C en comparación con el uso de xilano purificado de espelta y avena.

##### ***4.1.4.1. Optimización de la naturaleza de la fuente de carbono***

Las fuentes de carbono analizadas a una concentración de 1% y fueron categorizadas de la siguiente manera:

#### 4.1.4.1.1. Residuos lignocelulósicos

En esta categoría se analizaron 5 tipos de residuos (afrecho de trigo, paja de trigo, aserrín, rastrojo de maíz y hojas de olmo de roca), los cuales son la fuente de carbono principal a determinarse en la investigación.

**Tabla 10-4:** Actividad enzimática de xilanas (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en cinco residuos lignocelulósicos al 1% de concentración.

Fuente de carbono (Residuos lignocelulósicos)	A promedio	A diferencia	Actividad enzimática	Desviación estándar
<b>Control</b>	0,147	0,000	0,000	0,000
<b>Bagazo de maíz</b>	0,314	0,167	6,278	0,581
<b>Paja de trigo</b>	0,164	0,017	0,000	0,000
<b>Afrecho de trigo</b>	0,887	0,740	85,861	4,909
<b>Hojas de olmo de roca</b>	0,250	0,103	0,000	0,000
<b>Aserrín</b>	0,188	0,041	0,000	0,000
<b>Xilano</b>	1,026	0,879	105,167	8,587

Realizado por: Terry Solis, 2018.

#### 4.1.4.1.2. Azúcares purificadas

Se analizaron 5 azúcares purificadas (lactosa, sacarosa, D-sorbitol, D- Fructosa, D- Glucosa) con la finalidad de elegir una fuente de carbono suplementaria de fácil acceso para la cepa bacteriana durante las primeras horas de fermentación. Para el presente experimento se ejecutó un control independiente para cada tipo de sustancia utilizada puesto que son azúcares reductoras.

**Tabla 11-4:** Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en cinco azúcares purificadas al 1% de concentración.

Fuente de carbono (Azúcares purificadas)	A control	A promedio	A diferencia	Actividad enzimática	Desviación estándar
<b>Sacarosa</b>	1,44	2,092	0,652	73,639	7,857
<b>Sorbitol</b>	0,165	0,438	0,273	20,954	9,350
<b>Fructosa</b>	1,972	2,289	0,317	27,042	6,973
<b>Lactosa</b>	2,589	2,880	0,291	23,500	11,392
<b>Glucosa</b>	1,79	2,612	0,822	97,296	7,506

Realizado por: Terry Solis, 2018.

#### 4.1.4.2. Optimización de la concentración de la fuente de carbono

La optimización de la naturaleza de la fuente de carbono dio como resultado al afrecho de trigo como residuo lignocelulósico óptimo y la D- Glucosa como fuente de carbono suplementaria. Además, se debe tomar en cuenta la solubilidad del afrecho trigo para el diseño del experimento. Por tal razón se probaron diferentes concentraciones de afrecho de trigo de 0,5% a 5% manteniendo constante la concentración de glucosa en 0,5%.

**Tabla 12-4:** Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la concentración de afrecho de trigo (% m/v).

Concentración de Afrecho de Trigo	A control	A promedio	A diferencia	Actividad enzimática	Desviación estándar
<b>0,5</b>	0,335	1,024	0,335	78,708	12,505
<b>1</b>	0,46	1,230	0,460	90,028	0,287
<b>2</b>	0,387	0,926	0,387	57,991	21,068
<b>3</b>	0,697	1,363	0,697	75,537	5,085
<b>4</b>	0,838	1,661	0,838	97,319	4,556
<b>5</b>	1,173	1,466	1,173	23,778	4,052

Realizado por: Terry Solis, 2018.

#### 4.1.5. Optimización de las fuentes de nitrógeno

##### 4.1.5.1. Optimización de la naturaleza de la fuente de nitrógeno inorgánico

Las fuentes de nitrógeno inorgánico utilizadas para la optimización fueron: sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>), cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>) y nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) a una concentración de 1%, manteniendo constantes las condiciones físicas y fuente de carbono previamente determinadas.

**Tabla 13-4:** Actividad enzimática de xilanas (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en cinco fuentes inorgánicas de nitrógeno (1%).

Fuente inorgánica de nitrógeno (1%)	A control	A promedio	A diferencia	Actividad enzimática	Desviación estándar
<b>KNO3</b>	0,355	1,554	1,199	149,611	11,824
<b>NaNO3</b>	0,335	1,520	1,185	147,713	6,335
<b>NH4NO3</b>	0,476	1,747	1,271	159,611	9,035
<b>NH4Cl</b>	1,206	2,194	0,988	120,306	12,374
<b>(NH4)2SO4</b>	0,958	2,138	1,180	146,903	0,884

Realizado por: Terry Solis, 2018.

##### 4.1.5.2. Optimización de la concentración de la fuente de nitrógeno inorgánico

La optimización de la naturaleza de la fuente de nitrógeno inorgánico dio como resultado al nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) como óptima para la producción de xilanas por parte de la bacteria analizada. El experimento consistió en probar diferentes concentraciones de nitrato de amonio de 0,5% a 5% m/v.

**Tabla 14-4:** Actividad enzimática de xilanas (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la concentración de nitrato de amonio (% m/v).

Concentración de Nitrato de amonio	A control	A promedio	A diferencia	Actividad enzimática	Desviación estándar
<b>0,5</b>	0,357	1,674	1,317	165,931	1,670
<b>1</b>	0,644	1,655	1,011	123,431	1,080
<b>2</b>	0,517	1,431	0,914	109,981	9,019



<b>3</b>	0,482	1,412	0,930	112,250	14,737
<b>4</b>	0,494	1,548	1,054	129,403	14,437
<b>5</b>	1,136	2,000	0,864	103,083	15,758

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

#### *4.1.5.3. Optimización de la naturaleza de la fuente de nitrógeno orgánico.*

Las fuentes de nitrógeno orgánico utilizadas para la optimización fueron: extracto de levadura, peptona, urea, extracto de malta y triptona a una concentración de 1%, manteniendo constantes las condiciones físicas, fuentes de carbono y nitrógeno inorgánico previamente determinadas.

**Tabla 15-4:** Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas con el uso de cinco fuentes orgánicas de nitrógeno (1%).

<b>Fuente orgánica de nitrógeno (1%)</b>	<b>A control</b>	<b>A promedio</b>	<b>A diferencia</b>	<b>Actividad enzimática</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>Peptona</b>	0,424	1,719	1,295	162,944	2,161
<b>Extracto de malta</b>	0,836	2,022	1,186	147,759	11,408
<b>Triptona</b>	0,546	1,490	0,944	114,241	8,822
<b>Úrea</b>	0,502	1,298	0,796	93,593	13,265
<b>Extracto de levadura</b>	0,4	1,639	1,239	155,097	3,437

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

#### *4.1.6. Optimización de la relación entre las fuentes de carbono y nitrógeno*

Los experimentos previos permitieron determinar la naturaleza y concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno siendo estas: afrecho de trigo 4%, glucosa 0,5%, nitrato de amonio 0,5% y peptona de concentración desconocida.

Se estableció la relación entre la fuente principal de carbono (afrecho de trigo) y nitrógeno inorgánico (nitrato de amonio) como 8 a 1. El presente ensayo tuvo como finalidad determinar la relación de estas dos fuentes con la de nitrógeno orgánico (peptona), con las siguientes pruebas: 8:1:1, 8:1:2, 8:1:4, 8:1:5, 8:1:6, 8:1:8 en la preparación del medio de cultivo.

**Tabla 16-4:** Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la relación entre las fuentes de carbono y nitrógeno

Relación fuentes de Carbono/ Nitrógeno	A control	A promedio	A diferencia	Actividad enzimática	Desviación estándar
<b>8:1:1</b>	2,009	1,476	1,317	188,083	15,247
<b>8:1:2</b>	1,674	1,238	1,011	154,981	17,396
<b>8:1:4</b>	2,895	0,473	0,914	48,778	0,509
<b>8:1:5</b>	3,067	0,320	0,930	27,458	1,190
<b>8:1:6</b>	3,522	0,868	1,054	103,639	4,470
<b>8:1:8</b>	2,600	0,259	0,864	19,102	1,350

Realizado por: Terry Solis, 2018.

#### **4.1.7. Evaluación de la adición de iones metálicos y surfactantes.**

##### **4.1.7.1. Efecto de la adición de iones metálicos**

Se añadieron los iones sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso y níqueloso con una concentración 1 mM al medio de fermentación optimizado en experimentos anteriores con la finalidad de determinar el efecto que ejercen sobre la actividad enzimática de la xilanasa mediante la comparación con un experimento de control sin incorporar ningún aditivo.

**Tabla 17-4:** Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la adición 1mM de iones metálicos.

Iones metálicos añadidos	A control	A promedio	A diferencia	Actividad enzimática	Desviación estándar
<b>Control</b>	0,666	2,024	1,358	171,694	19,334
<b>Na+</b>	0,488	1,432	0,944	114,194	12,772
<b>K+</b>	0,427	1,354	0,927	111,880	7,893
<b>Mg ++</b>	0,478	1,622	1,144	142,019	6,986
<b>Ca++</b>	0,415	1,534	1,119	138,500	6,544
<b>Fe++</b>	0,542	1,761	1,219	152,343	8,666
<b>Ni++</b>	0,523	1,522	0,999	121,833	3,916
<b>Cu++</b>	1,479	1,996	0,517	54,935	4,073
<b>Co++</b>	0,776	1,856	1,080	133,130	14,502

<b>Mn++</b>	0,442	1,172	0,730	84,403	15,208
-------------	-------	-------	-------	--------	--------

Realizado por: Terry Solis, 2018.

#### 4.1.7.2. Efecto de la adición de surfactantes

Se añadieron los surfactantes Polisorbato-20 (TWEEN-20), dodecil sulfato de sodio(SDS) y Triton X-100 con una concentración 0,1% al medio de fermentación optimizado en experimentos anteriores con la finalidad de determinar el efecto que ejercen sobre la actividad enzimática de la xilanasa mediante la comparación con un experimento de control sin incorporar ningún aditivo.

**Tabla 18-4:** Actividad enzimática de xilanasa (IU/Lmin) calculada con las absorbancias (A) registradas en función de la adición 0,1% de surfactantes.

Surfactantes añadidos	A control	A promedio	A diferencia	Actividad enzimática	Desviación estándar
Control	0,666	2,024	1,358	171,694	19,334
TWEEN-20	0,481	1,612	1,131	140,097	26,525
SDS	0,67	2,700	2,030	264,958	2,273
TRITON X-100	0,604	1,822	1,218	152,250	12,192

Realizado por: Terry Solis, 2018.

## 4.2. Pruebas de hipótesis

### 4.2.1. Hipótesis general

- La optimización de la producción de xilanasa bacteriana a partir de *Bacillus sp. K1* permitirá la reutilización de residuos lignocelulósicos industriales de bajo valor económico como sustrato mediante la técnica de fermentación sumergida.

Tras la optimización de los parámetros involucrados en la producción de xilanasa bacteriana por la bacteria *Bacillus sp. K1* se realizó una comparación entre la actividad enzimática inicial y final.

**Tabla 19-4:** Comparación de la actividad enzimática de xilanasa bacteriana (IU/ Lmin) producida con las variables iniciales y finales asociadas a la fermentación.

Variable	Inicial		Final	
Temperatura(°C)	37		35	
pH	7		6	
Volumen de inóculo (% v/v)	1		1	
Velocidad de agitación (rpm)	200		200	
Tiempo de incubación (h)	36		36	
Composición del medio de fermentación (%)				
Fuente de Carbono	Xilano de espelta y avena	1	Afrecho de trigo	4
			Glucosa	0,5
Fuente orgánica de nitrógeno	Extracto de levadura	0,05	Peptona	0,5
Fuente inorgánica de nitrógeno	Nitrato de sodio	0,1	Nitrato de amonio	0,5
Surfactantes	----	----	Dodecil sulfato de sodio	0,1
Sustancias adicionales	Fosfato ácido de potasio	0,1	Fosfato ácido de potasio	0,1
	Cloruro de potasio	0,1	Cloruro de potasio	0,1
	Sulfato de magnesio	0,05	Sulfato de magnesio	0,05
Actividad enzimática	106.05±8.65		264.96±7.89	

Realizado por: Terry Solis, 2018.

El porcentaje de optimización alcanzado en la presente investigación se calculó con la división entre la actividad enzimática obtenida con las variables finales e iniciales de fermentación investigadas.

$$\%_{OPT} = \frac{Ac_{fxilanasas}}{Ac_{ixilanasas}} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

$\%_{OPT}$  = Porcentaje de optimización

$Ac_{fxilanasas}$  = Actividad final de xilanasa ( $\mu\text{mol xilosa/ Lmin}$ ).

$Ac_{ixilanasas}$  = Actividad inicial de xilanasa ( $\mu\text{mol xilosa/ Lmin}$ ).

$$\%_{OPT} = \frac{264,96 \mu\text{mol xilosa} / \text{Lmin}}{106,05 \mu\text{mol xilosa} / \text{Lmin}} * 100$$

$$\%_{OPT} = 248,79\%$$

#### 4.2.2. Hipótesis específicas

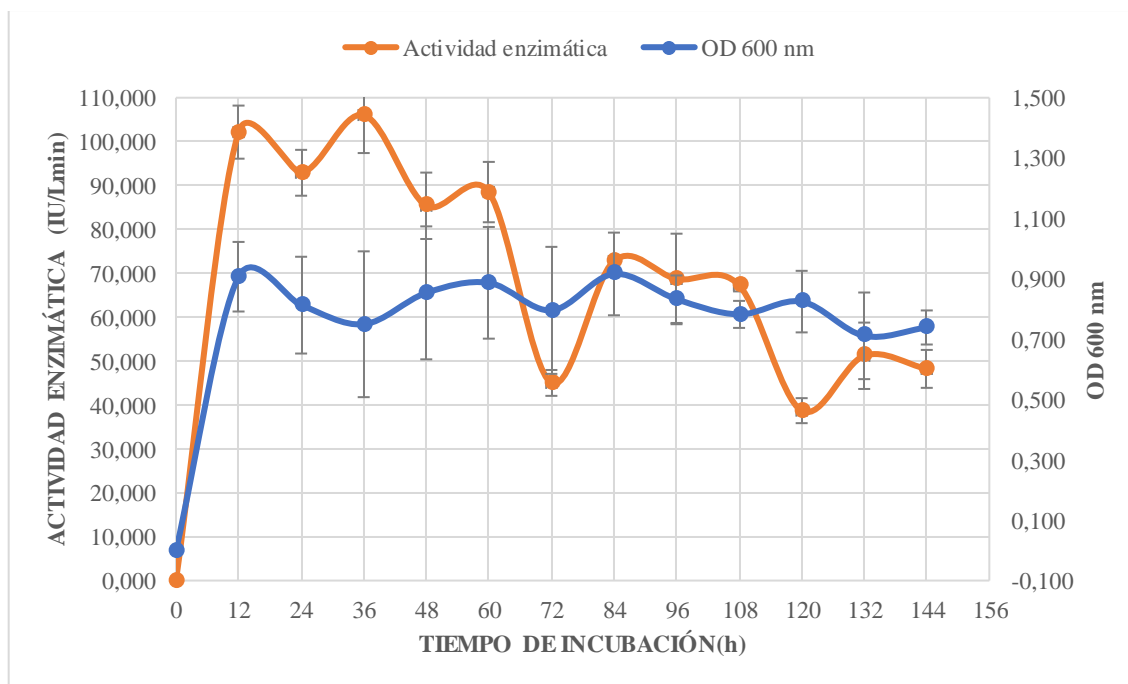
##### 4.2.2.1. Hipótesis 1

- La fermentación sumergida del xilano purificado de espelta y avena por acción de *Bacillus sp. K1* permitirá el análisis de su curva de crecimiento y su relación con la producción periódica de xilanasa.

Se diseñó un experimento por triplicado que consistió en la fermentación de 20mL un medio de sales minerales (MSM), con la bacteria previamente activada (1% volumen de inóculo), en las siguientes proporciones: xilano de purificado de espelta y avena 1 g, nitrato de sodio 0.1 g, fosfato ácido de potasio 0.1 g, cloruro de potasio 0.1 g, sulfato de magnesio 0.05 g y extracto de levadura 0.05 g en 100 mL.

Adicionalmente, las condiciones de fermentación fueron: pH 7, temperatura 37 °C y 200 rpm de velocidad de agitación por 144 h (6 días). Las muestras fueron tomadas cada 12 h.

La curva de crecimiento se desarrolló mediante el análisis de la densidad óptica en las muestras tomadas. La curva de producción de xilanasa se desarrolló con las actividades enzimáticas en  $\mu\text{mol xilosa} / \text{Lmin}$  calculadas en base a las absorbancias registradas por el método de Miller, la curva de calibración de xilosa y la ecuación 2. Todos los resultados se muestran con barras de error equivalentes a  $\pm$ Desviación estándar de las medidas tomadas.



**Gráfico 2-4:** Producción periódica de xilanasa y densidad óptica en función del tiempo de incubación cada 12 h por 6 días (144 h).

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

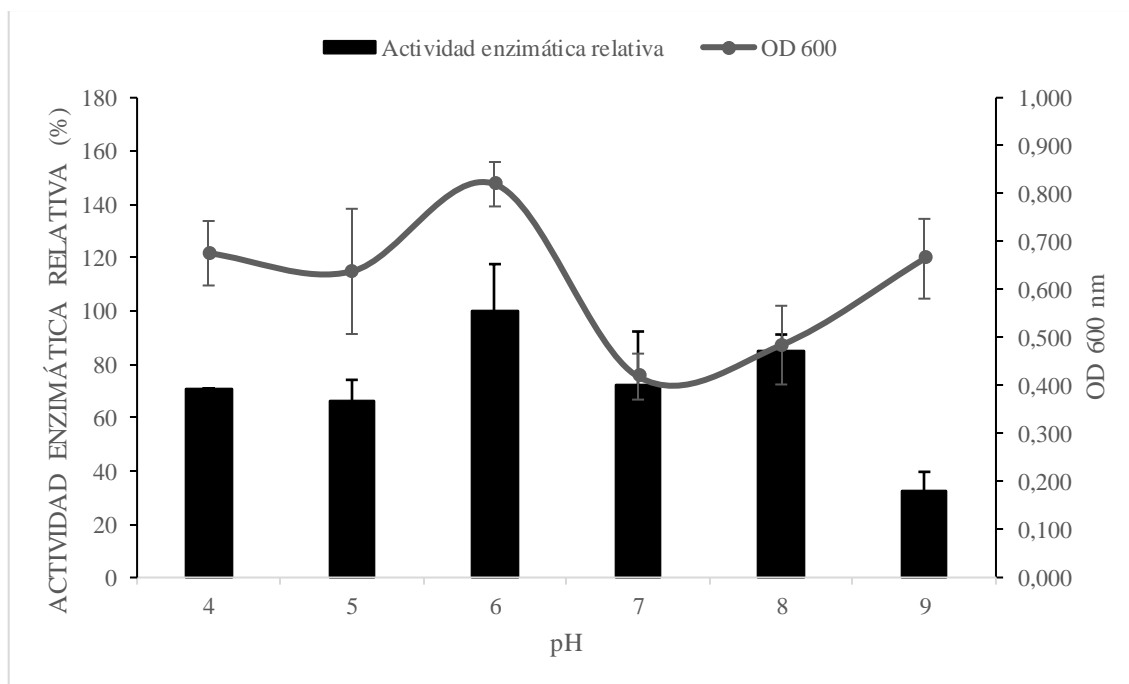
El pico de producción de la enzima se encuentra a 36 h en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano y es equivalente a  $106,046 \pm 8,052$  IU/ Lmin. El tiempo óptimo encontrado se utilizará para experimentos posteriores

#### 4.2.2.2. Hipótesis 2

- Mediante la variación del pH, temperatura y volumen de inóculo en el cultivo de *Bacillus sp. K1* se determinará las condiciones físicas óptimas de su cultivo.

La optimización de las condiciones físicas de cultivo (pH, temperatura y volumen de inóculo) se llevó a cabo mediante un experimento independiente por cada variable, con tres repeticiones. La composición del medio de cultivo se mantuvo constante y las muestras fueron tomadas en el pico de producción de xilanasa a 36 h.

La determinación del pH óptimo de fermentación consistió en la comparación de la actividad enzimática relativa y la densidad óptica de las muestras en función de distintas medidas de pH entre 4 y 9.

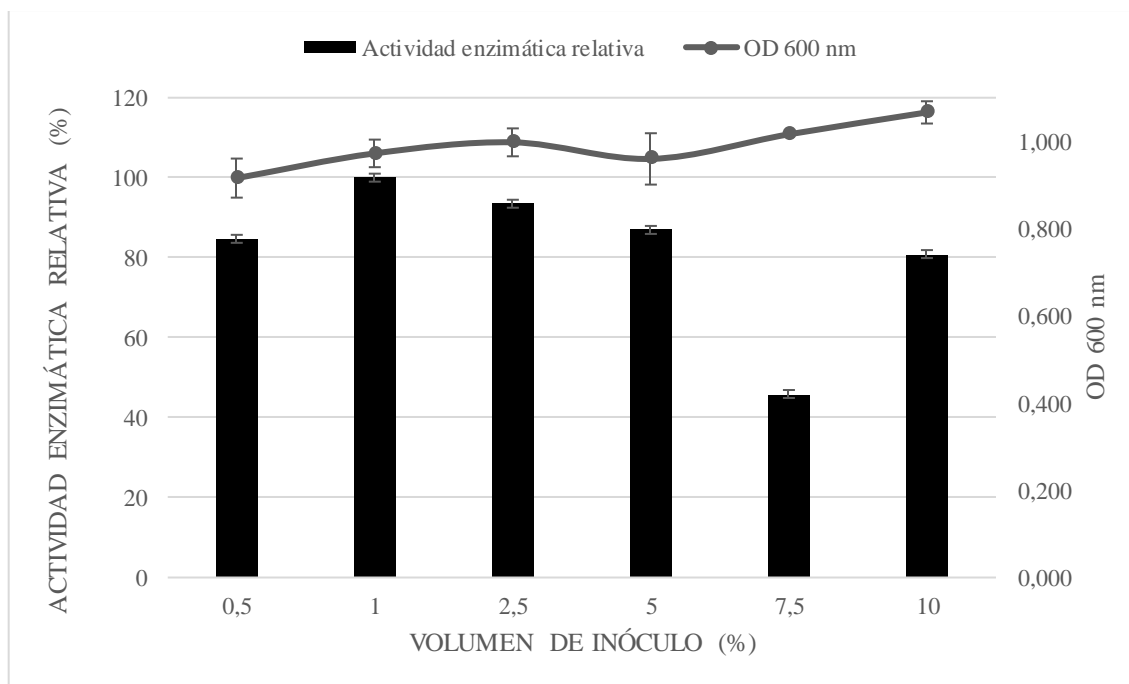


**Gráfico 3-4:** Optimización del pH de fermentación mediante la comparación de la actividad enzimática relativa y densidad óptica.

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

El pH óptimo del medio de fermentación es equivalente a 6, puesto que se obtuvo la mayor producción de xilanasa de  $138,083 \pm 20,050$  IU/ Lmin y la mayor densidad óptica en estas condiciones.

La determinación del volumen de inóculo óptimo (% v/v) para la fermentación consistió en la comparación de la actividad enzimática relativa y la densidad óptica de las muestras en función de distintas medidas del volumen entre 0,5 y 10% con pH 6.



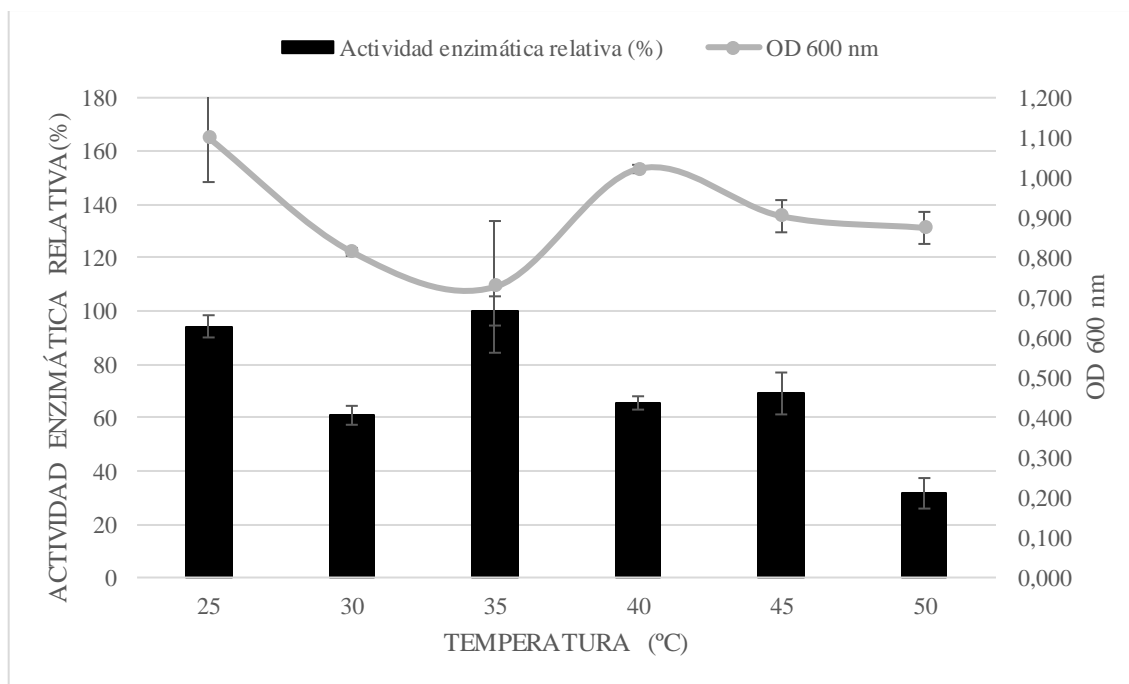
**Gráfico 4-4:** Optimización del volumen de inóculo mediante la comparación de la actividad enzimática relativa y densidad óptica.

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

Con el uso de 1% v/v de inóculo en la fermentación, se obtiene una actividad enzimática superior de  $154,843 \pm 7,587$  IU/ Lmin, y en 10% v/v la densidad óptica es superior. Sin embargo, se eligió la condición de 1% debido a que el propósito principal del experimento es optimizar la producción de la enzima.

La determinación de la temperatura óptima (°C) para la fermentación consistió en la comparación de la actividad enzimática relativa y la densidad óptica de las muestras en función de la temperatura con el uso de varias incubadoras programadas entre 25 °C y 50 °C con pH 6 y 1% de inóculo.





**Gráfico 5-4:** Optimización de la temperatura de fermentación mediante la comparación de la actividad enzimática relativa y densidad óptica.

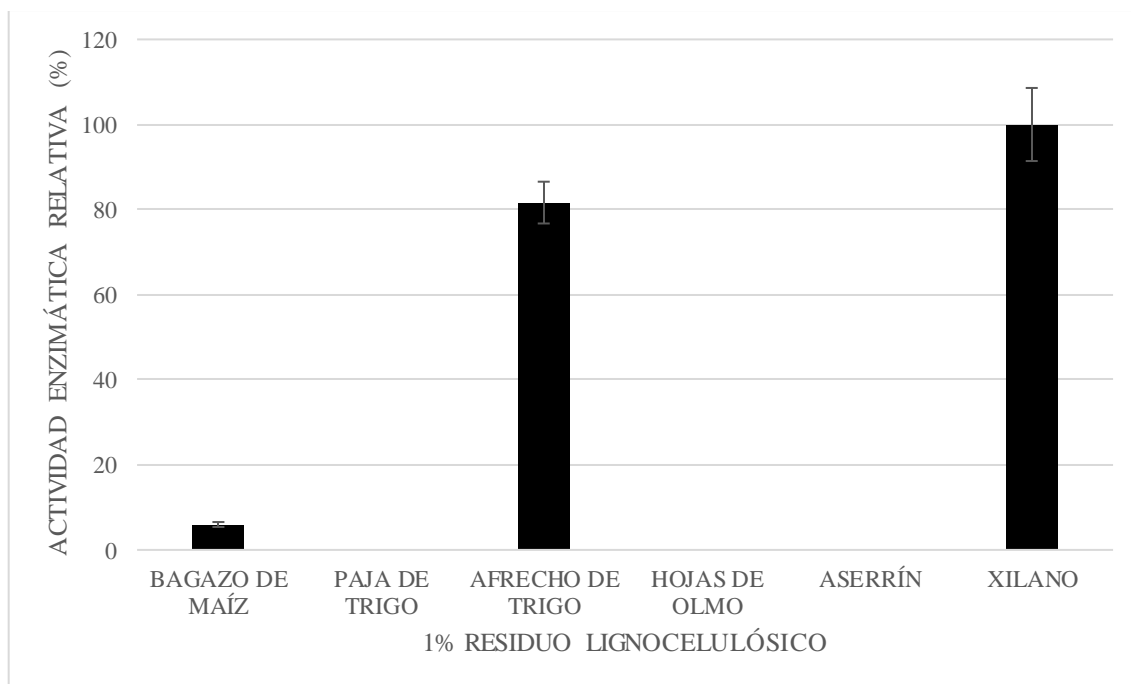
**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

La temperatura óptima de fermentación se determinó en 35 °C, puesto que se obtuvo una actividad enzimática superior equivalente a  $158,685 \pm 5,486$  IU/ Lmin. En contraste, la densidad óptica demuestra que el crecimiento microbiano es relativamente bajo.

#### 4.2.2.3. Hipótesis 3

- La utilización de los residuos lignocelulósicos y azúcares purificados como sustrato para la producción de xilanas bacteriana por la cepa *Bacillus sp. K1* permitirá determinar la fuente óptima de carbono en comparación con el uso de xilano purificado de espelta y avena.

La fuente de carbono utilizada en experimentos anteriores fue xilano purificado, el cual debe ser reemplazado con un residuo lignocelulósico y suplementado con una azúcar purificada. Para los fines consiguientes se diseñó un experimento para comparar la actividad enzimática generada con 5 residuos lignocelulósicos y 5 azúcares purificados como fuente de carbono a 1% m/v.

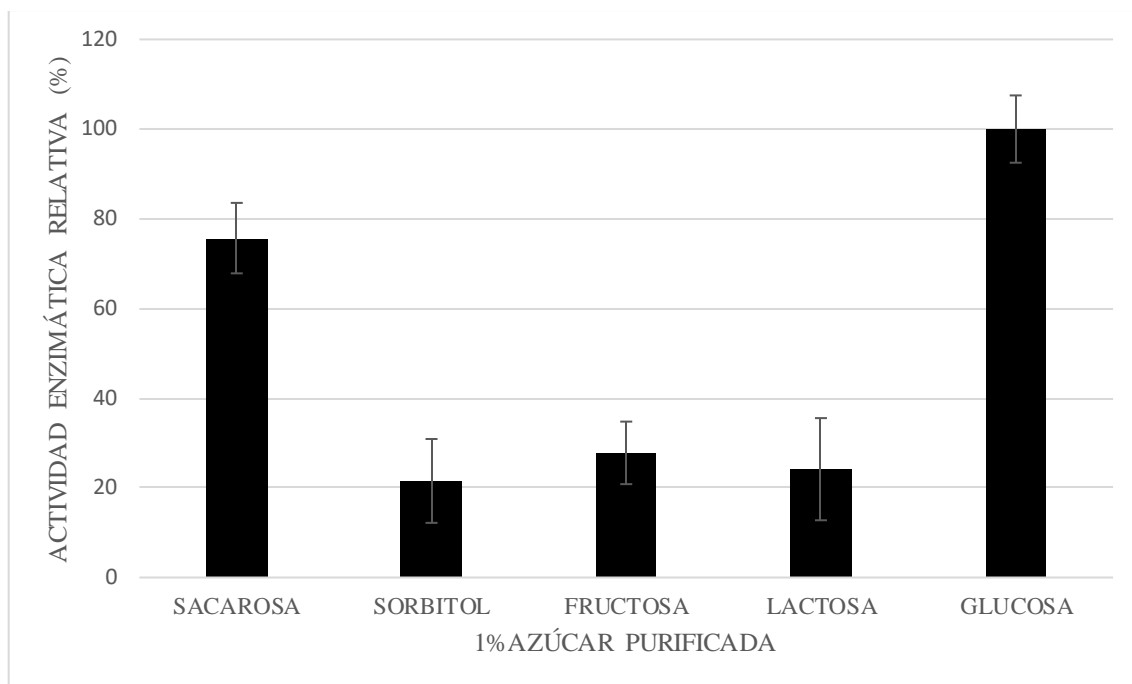


**Gráfico 6-4:** Optimización de la naturaleza de la fuente de carbono mediante la comparación de la actividad enzimática relativa de residuos lignocelulósicos al 1% con xilano purificado.

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

El afrecho de trigo se identificó como el residuo lignocelulósico más idóneo para la producción de xilanasa por tener un 80% de actividad con relación al xilano purificado

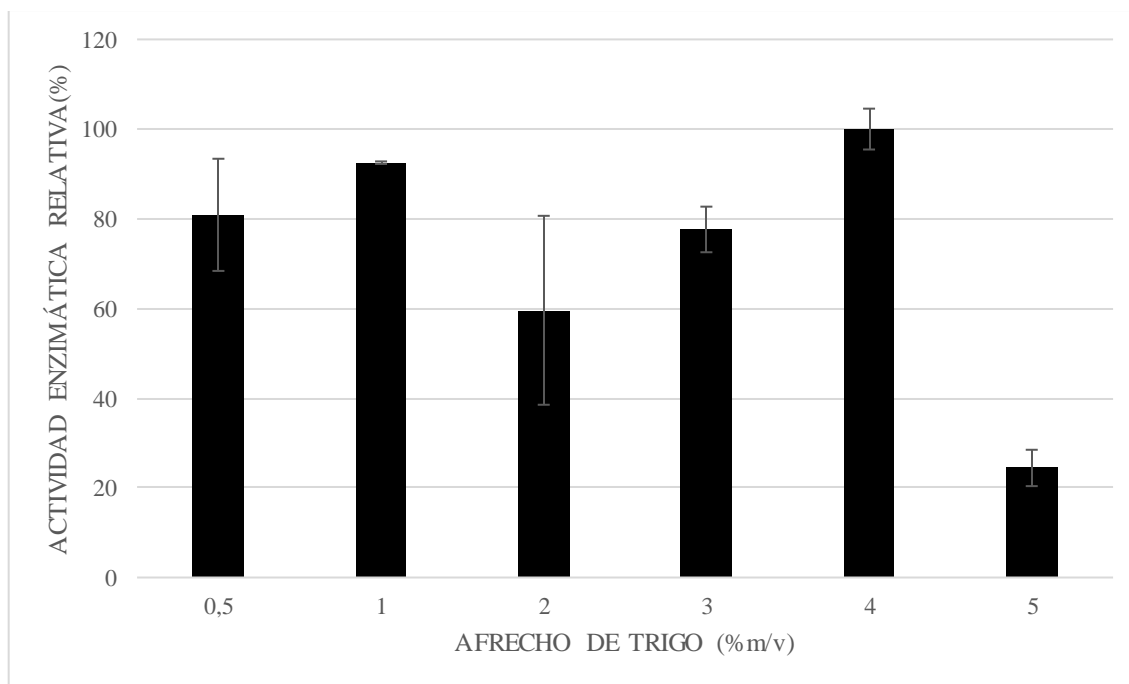
Posteriormente se optimizó la concentración de la fuente de carbono principal (afrecho de trigo) en un rango de 0,5 a 5% manteniendo constante la fuente suplementaria (glucosa) en 0,5%.



**Gráfico 7-4:** Optimización de la naturaleza de la fuente de carbono mediante la comparación de la actividad enzimática relativa de azúcares purificadas al 1%.

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

La glucosa es la fuente de carbono suplementaria más idónea para la producción de xilanasas por generar la máxima actividad enzimática con respecto al resto de azúcares purificadas, con un valor de  $97,296 \pm 7,506$  IU/Lmin.



**Gráfico 8-4:** Optimización de la concentración de la fuente de carbono mediante la comparación de la actividad enzimática en porcentajes de afrecho trigo con glucosa a 0,5%.

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

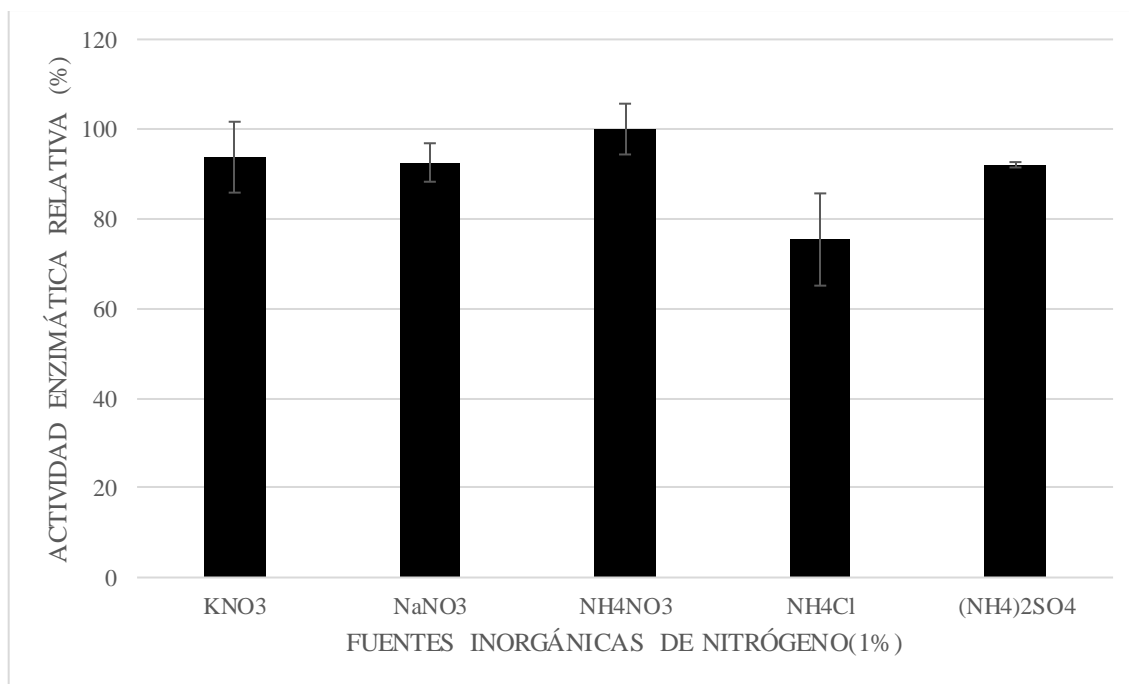
La concentración óptima de afrecho de trigo se encontró en 4% con la fuente suplementaria de glucosa en 0,5%; puesto que se generó la actividad enzimática superior equivalente a  $97,319 \pm 4,556$  IU/Lmin.

#### 4.2.2.4. Hipótesis 4

- La evaluación de diferentes fuentes inorgánicas y orgánicas de nitrógeno en el cultivo de la cepa *Bacillus sp. K1* permitirá identificar su efecto sobre la actividad enzimática de la xilanasa bacteriana producida.

Las fuentes de nitrógeno fueron optimizadas en función de su tipo, clasificándolas en inorgánica y orgánica. Se diseñaron tres experimentos independientes con la finalidad de identificar la naturaleza de ambas fuentes y la concentración necesaria de fuente inorgánica.

La naturaleza de la fuente inorgánica de nitrógeno se determinó mediante el análisis de la actividad enzimática relativa generada al utilizar 5 fuentes inorgánicas de nitrógeno al 1% de concentración con las condiciones optimizadas en experimentos anteriores.

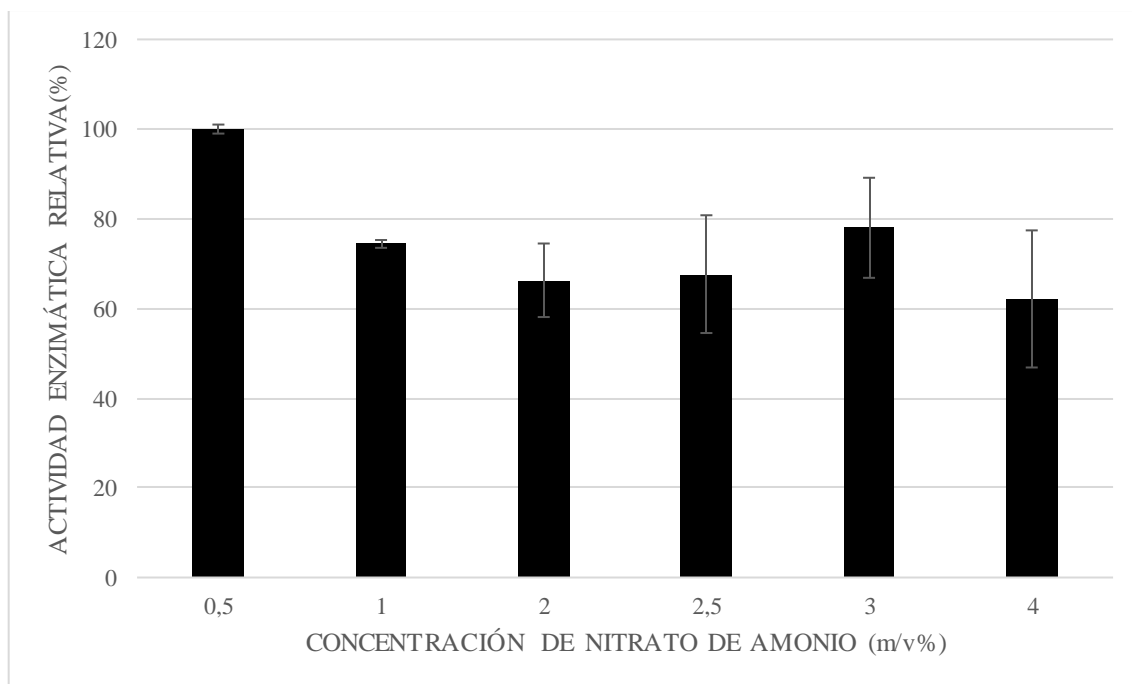


**Gráfico 9-4:** Optimización de la naturaleza de la fuente de nitrógeno inorgánico mediante la comparación de la actividad enzimática con diferentes sustancias a 1% m/v.

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

La fuente óptima de nitrógeno es la correspondiente al nitrato de amonio, puesto que se generó la mayor actividad enzimática relativa en comparación a los otros ensayos, con un valor de  $159,611 \pm 9,035$  IU/Lmin.

A continuación, se diseñó un experimento con la finalidad de encontrar la concentración óptima de nitrato de amonio en el medio de fermentación, mediante análisis de diferentes porcentajes de dicha sustancia en un rango de 0,5 a 5%.

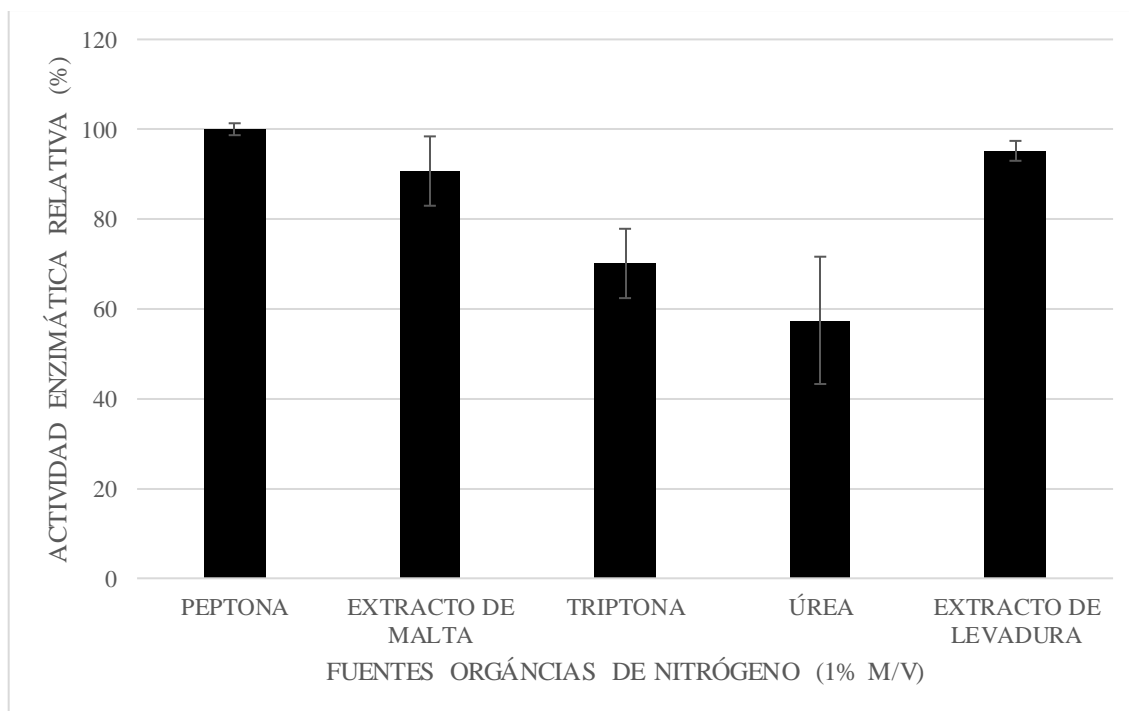


**Gráfico 10-4:** Optimización de la concentración de nitrato de amonio mediante la comparación de la actividad enzimática de diferentes porcentajes m/v de la sustancia.

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

La concentración de nitrato de amonio que induce la mayor producción de enzima xilanasa se determinó en 0,5% debido a que la actividad enzimática relativa es mayor a los otros ensayos con un valor de  $165,931 \pm 1,670$  IU/Lmin.

Posteriormente se determinó la naturaleza de la fuente orgánica de nitrógeno con la comparación de la actividad enzimática relativa generada al utilizar 5 fuentes diferentes.



**Gráfico 11-4:** Optimización de la naturaleza de la fuente de nitrógeno orgánico mediante la comparación de la actividad enzimática con diferentes sustancias a 1% m/v.

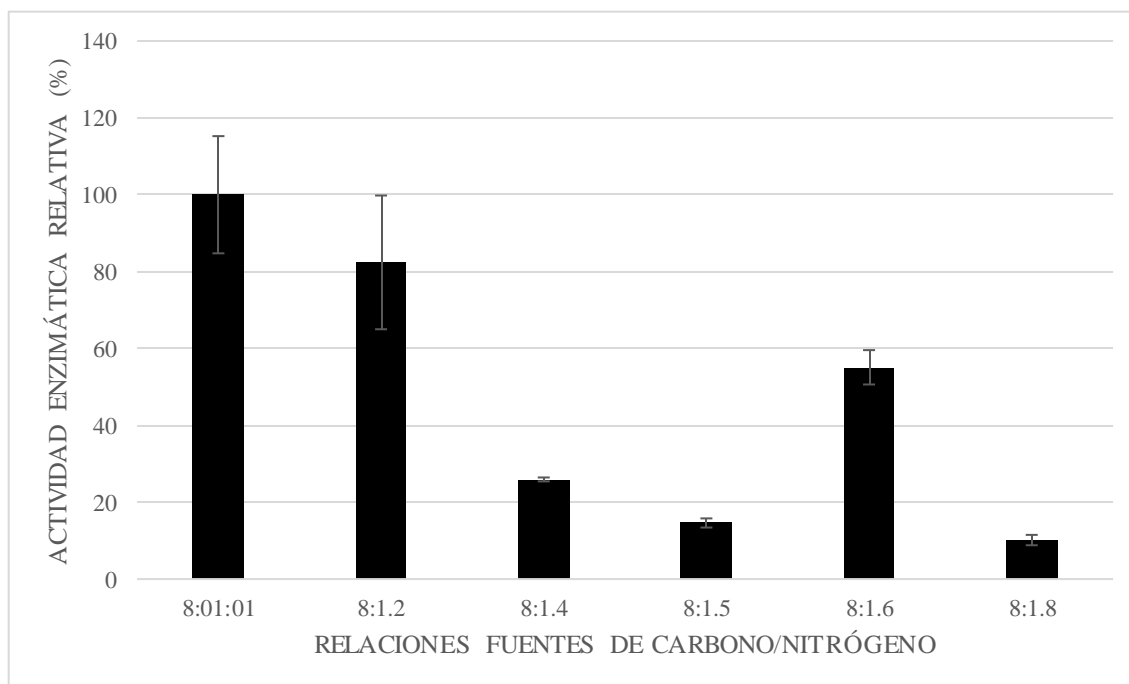
**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

La peptona se determinó como la fuente óptima para la producción de xilanasa por tener una actividad enzimática superior a los otros ensayos y equivalente a  $162,944 \pm 2,161$   $\mu\text{mol}$  xilosa/Lmin.

#### 4.2.2.5. Hipótesis 5

- El análisis de las relaciones entre la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas en el cultivo de *Bacillus sp. K1* permitirá determinar la más favorable para la producción de xilanasa bacteriana con mayor actividad enzimática.

Se establecieron diferentes relaciones entre las concentraciones de las fuentes de carbono (afrecho de trigo), nitrógeno inorgánico (nitrato de amonio) y orgánico (peptona), manteniendo las dos primeras constantes (8:1) y variando la fuente orgánica.



**Gráfico 12-4:** Optimización de la relación entre la concentración de las fuentes de nitrógeno y carbono mediante la comparación de la actividad enzimática con diferentes sustancias a 1% m/v.

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

La relación más idónea para maximizar la actividad enzimática con un valor de  $188,083 \pm 15,247$  IU/ Lmin es 8:1:1. La relación mencionada es equivalente a un 4% de afrecho de trigo, 0,5% de nitrato de amonio y 0,5% de peptona.

#### 4.2.2.6. Hipótesis 6

- La adición de diferentes iones metálicos (sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso, níqueloso, cúprico, cobaltoso y manganeso) y surfactantes (Polisorbato-20, dodecil sulfato de sodio y Triton X-100) en el medio de cultivo de la cepa *Bacillus sp. K1* influirá en la actividad enzimática de la xilanasa bacteriana producida.

El efecto que tienen los iones metálicos mencionados se analizó mediante la adición de cada uno de estos en una concentración 1mM al medio de fermentación. Su actividad enzimática relativa fue comparada con el experimento control.

**Tabla 20-4:** Comparación de la actividad enzimática de xilanasa relativa (%) de iones metálicos añadidos en concentración 1mM con respecto al experimento de control.



<b>Iones metálicos añadidos</b>	<b>Actividad enzimática relativa</b>
<b>Control</b>	100
<b>Na+</b>	66.51
<b>K+</b>	65.16
<b>Mg ++</b>	82.72
<b>Ca++</b>	80.67
<b>Fe++</b>	88.73
<b>Ni++</b>	70.96
<b>Cu++</b>	32.00
<b>Co++</b>	77.54
<b>Mn++</b>	49.16

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

La adición de los iones en general inhibió la actividad enzimática, sin embargo, los iones cúprico y manganeso influyeron en el decremento más significativo de la actividad de xilanas con un 32% y 49,16% de inhibición respectivamente comparado con el experimento de control.

El efecto que tienen los surfactantes previamente mencionados se analizó mediante la adición de cada uno de estos en una concentración 0,1% al medio de fermentación. A continuación, se relaciona la actividad enzimática relativa resultante con cada surfactante añadido.

**Tabla 21-4:** Comparación de la actividad enzimática de xilanas relativa (%) de surfactantes añadidos en concentración 0,1% con respecto al experimento de control.

<b>Iones metálicos añadidos</b>	<b>Actividad enzimática relativa</b>
<b>Control</b>	100
<b>TWEEN-20</b>	81,60
<b>SDS</b>	154,32
<b>TRITON X-100</b>	88,68

**Realizado por:** Terry Solis, 2018.

El análisis de las actividades enzimáticas relativas y calculadas con relación al experimento de control demuestran que la adición del surfactante dodecil sulfato de sodio (SDS) en una concentración de 0,1% al medio de fermentación produce un incremento de la actividad enzimática en 154,32% equivalente a  $264,958 \pm 2,273$  IU/ Lmin.

### 4.3. Discusión de resultados

La construcción de una curva de calibración para la aplicación del método de Miller fue el primer ensayo realizado y consistió en relacionar la absorbancia registrada en soluciones de concentración conocida de xilosa entre 0 y 1000 µg/mL con la técnica de regresión lineal simple.

Los resultados condujeron a una ecuación que relaciona las dos variables con un coeficiente de correlación igual a 0,997; este valor según Miller y Miller (2002, p. 116) está dentro del rango para curvas de calibrado en la práctica analítica que debe ser mayor a 0,99.

La producción de xilanasa bacteriana por parte de *Bacillus sp. K1* fue verificada y el tiempo de fermentación idóneo se determinó mediante la relación entre la densidad óptica y la producción de xilanasa en función del tiempo de fermentación transcurridas 36 h. El pico más alto de densidad óptica y actividad enzimática es equivalente a  $106,046 \pm 8,052$  µmol xilosa/ Lmin, es decir que tanto el crecimiento bacteriano como la producción de enzimas, utilizando como sustrato xilano purificado, fueron optimizados.

Las condiciones físicas involucradas en la producción de xilanasa tales como pH de fermentación, volumen de inóculo y temperatura de optimización se optimizaron con experimentos independientes. El pH se determinó en 6, tanto para densidad óptica como para actividad enzimática. Esta particularidad demuestra condiciones relativamente ácidas, lo cual condiciona la utilización de la enzima para procesos de biobleaching, el cual requiere pH de 8 en adelante.

El volumen de inóculo y temperatura se determinaron para actividad enzimática en 1% v/v y 35 °C respectivamente; cabe mencionar que dichos parámetros no fueron óptimos para el crecimiento bacteriano. Sin embargo, se seleccionaron porque el propósito de la investigación es maximizar la producción de xilanasa. La temperatura coincide con la especie *Bacillus subtilis* detallada por Irfan, et al. (2016, p. 139).

El reemplazo del xilano purificado con un residuo lignocelulósico como fuente de carbono disminuye la actividad enzimática producida por fermentación sumergida en un 81% comparado con el ensayo utilizando afrecho de trigo.

Los residuos restantes demostraron inhibir en gran medida la producción de la enzima. Por tal razón se decidió suplementar la fuente de carbono con un azúcar purificado, glucosa. El uso de afrecho se corroboró con 3 especies de hongos y 2 de bacterias utilizadas en investigaciones previas de este tipo.

La concentración de afrecho de trigo a utilizarse para la producción de xilanasa se ve limitada por la solubilidad del mismo en el medio de fermentación, razón por la cual su efecto se determinó en un rango de concentración de 0,5 a 5% manteniendo constante la glucosa en 0,5%. La concentración óptima de afrecho de trigo se identificó en 4% con glucosa al 0,5%.

La fuente de nitrógeno inorgánico se determinó con la adición de 5 sustancias en concentración 1% al medio de fermentación. Las actividades enzimáticas relativas del sobrenadante con nitrato de potasio, nitrato de sodio, sulfato de amonio y nitrato de amonio tienen valores similares.

La elección del nitrato de amonio se hizo por dos razones: demostró tener la mayor actividad enzimática y al realizar la cotización con el proveedor Sigma Aldrich en internet tuvo menor precio que las demás sustancias.

La concentración óptima de nitrato de amonio se determinó en un rango de 0,5-5%. La dosis de nitrato de amonio es equivalente a 0,5% para maximizar la producción de xilanasa bacteriana. Por lo tanto, la relación entre la concentración porcentual de afrecho de trigo y nitrato de amonio es 8 a 1.

La fuente de nitrógeno orgánico fue determinada con la adición de 5 sustancias en concentración 1% al medio de fermentación. Las actividades enzimáticas relativas del sobrenadante con la aplicación de peptona, extracto de levadura y extracto de malta tienen valores similares.

La peptona fue escogida debido a que demostró tener la mayor actividad enzimática y al realizar la cotización con el proveedor Sigma Aldrich en internet tuvo menor precio que las demás sustancias. El uso de peptona se corroboró con 3 especies de hongos y 2 de bacterias utilizadas en investigaciones previas de este tipo.

La relación entre la concentración porcentual de las fuentes de carbono y nitrógeno se determinó con la finalidad de maximizar la actividad enzimática de xilanasa. La relación del porcentaje de afrecho de trigo y nitrato de amonio se encontró en experimentos previos de 8 a 1. El porcentaje de peptona se halló equivalente a 8:1:1.

El efecto de la adición de los iones sodio, potasio, magnesio, calcio, ferroso, níqueloso, cúprico, cobaltoso y manganeso al medio de fermentación en concentración 1mM se realizó con experimentos independientes con la finalidad de comparar la actividad su actividad enzimática con un experimento de control sin la incorporación de aditivos.

En general, la adición de los iones mencionados inhibió la actividad enzimática. Sin embargo, cabe recalcar que los iones cúprico y manganeso influyeron en el decremento más significativo de la actividad de xilanasas, lo cual se puede deber al bloqueo de la secreción de proteína en el medio de fermentación según Sharma, et al. (2007, p. 487).

El efecto de la adición de los surfactantes polisorbato-20 (Tween-20), dodecil sulfato de sodio y Triton X-100 en concentración 0,1% se realizó con experimentos independientes con la finalidad de comparar la actividad su actividad enzimática con un experimento de control sin la incorporación de aditivos.

La incorporación de Polisorbato-20 y Tritón X-100 mostró un decremento de la actividad enzimática relativa al experimento de control. Sin embargo, la adición de dodecil sulfato de sodio incrementó significativamente dicho parámetro. Este comportamiento puede ser explicado porque la adición de surfactantes al medio de cultivo ejerce diferentes efectos en la secreción de enzimas, dependiendo del grado en el que afecta la permeabilidad de las membranas celulares según Maheswar & Satyanarayana (2003, p. 195).

La comparación de las actividades enzimáticas producidas con las variables previas y posteriores asociadas a la fermentación permitió determinar un valor final de  $264.96 \pm 7.89 \mu\text{mol xilosa/ Lmin}$ , el cual se calculó que es 248,79% mayor a la actividad enzimática encontrada al inicio del presente proyecto.

## CONCLUSIONES

- La bacteria *Bacillus sp. KI*, previamente aislada y determinada como productora de celulasa por personal del laboratorio para enzimas, bioproductos y biorremediación de la Universidad de Lakehead, Ontario, Canadá demostró ser productora de xilanasa bacteriana con una actividad enzimática de  $106,046 \pm 8,052$  IU/Lmin y un tiempo de fermentación óptimo de 36h.
- El afrecho de trigo ha sido encontrado como el sustrato lignocelulósico más idóneo para la producción de xilanasa bacteriana y ha sido corroborado por investigaciones previas tanto con especies de hongos como de bacterias. La adición de glucosa como fuente suplementaria de carbono permitió maximizar dicha producción.
- Las condiciones físicas óptimas asociadas a la producción de xilanasa bacteriana fueron pH de 6, temperatura de 35°C y volumen de inóculo 1%. En referencia a la composición del medio de fermentación se ha determinado de la siguiente manera: Afrecho de trigo 4% (fuente principal de carbono), Glucosa 0,5% (Fuente suplementaria de carbono), nitrato de amonio 0,5% (fuente inorgánica de nitrógeno), fosfato ácido de potasio 0,1%, cloruro de potasio 0,1%, sulfato de magnesio 0,05%, peptona 0,5% (fuente orgánica de nitrógeno), dodecil sulfato de sodio 0,1% (surfactante) para generar una actividad enzimática de  $264.96 \pm 7.89$  IU/Lmin.
- Los inhibidores que generaron el mayor decremento en la actividad enzimática de xilanasa fueron los iones cúprico y manganoso con 32% y 49,16% de inhibición comparado con el experimento de control.
- La optimización de los diferentes parámetros de producción condujo al incremento de la actividad enzimática de 248,79% con relación a los parámetros asumidos al comienzo de la investigación.

## RECOMENDACIONES

- La aplicación de la xilanasa estudiada en biobleaching de pulpa de papel no será viable debido a que este proceso requiere una enzima que trabaje a altas temperatura, pH y libre de celulasas.
- Las condiciones físicas de fermentación y la producción verificada tanto de celulasa como de xilanasa por parte de la bacteria *Bacillus sp. K1* favorecen su aplicación futura en la industria del bioetanol de segunda generación.
- El control de los inhibidores más importantes (iones cúprico y manganoso) debe ser exhaustivo en caso de una futura réplica del proceso a escala piloto y posterior escala industrial.

## BIBLIOGRAFÍA

**ARNOLD, Thomas; & LINKE, Dirk.** "Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins". *Biotechniques*, nº43(2007), (Alemania), pp. 427-430.

**AZIAKOU, Jeff; et al.** *Producción de Bioetanol de segunda generación: Una oportunidad histórica para Brasil*. [En línea] . Filadelfia: Wharton University, 2017. [Consulta: 26 Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.knowledgeatwharton.com.es/article/produccion-etanol-segunda-generacion>.

**BATTAN, Bindu; et al.** "Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry". *Enzyme and Microbial Technology*, Vol41, nº6 (2007), (India) pp. 733-739.

**BERNIER, Roger; et al.** "Isolation and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis*". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol46, nº2 (1983), (Canadá) pp. 511-514.

**BERTANI, Giuseppe.** "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*". *Journal of Bacteriology*, Vol 62, nº3 (1955), (Estados Unidos), pp. 293-300.

**BIO BASIC INC.** *Better Bradford Protein Assay Kit*. Markham, Estados Unidos: Bio Basic, 2017, pp. 1-5

**BIOSYNTH, CHEMISTRY AND BIOLOGY.** *Xylan from oat spelts*. [En línea]. [Consulta: 26 Febrero 2018]. 2017. Disponible en: <https://www.biosynth.com/en/products/life-science/products/X-6540.html?sprache=en>.

**BIOTEK INSTRUMENTS.** *Biotek*. [En línea]. [Consulta: 26 Febrero 2018]. 2017. Disponible en: <https://www.biotek.es/es/products/literature-request.html>.

**BOCCHINI, David; et al.** "Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation". *Process Biochemistry*, Vol40, nº12 (2005), (Brasil), pp. 3653-3659.

**CALDWELL, Daniel** "Microbial Physiology and Metabolism". *Wm. C. Brown Publishers*, (1995), (Estados Unidos), pp. 55-59.

**CARRERO, Isabel; & HERRÁEZ, Ángel.** *Surfactantes*. [En línea]. [Consulta: 16 de Enero 2018]. 2015. Disponible en: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/surfactantes.htm>.

**CARRILLO, Ulises.** *Enzinetic UPIIG*. [En línea]. [Consulta: 30 de Enero 2018]. 2016. Disponible en: <https://sites.google.com/site/enzineticupiig/bradford-y-dns>.

**CHANDER, Ramesh; et al.** "Optimization of xylanase production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*". *Process Biochemistry*, Vol. 33, n°6 (1998), (India), pp. 641-647.

**COLLADO, Martín.** "*Diseño y Síntesis de Compuestos Orgánicos Bioactivos*". [En línea]. [Último acceso: 31 Enero 2018]. España: 2014. Disponible en: <https://ocw.uma.es/ciencias/disenio-y-sintesis-de-compuestos-organicos-bioactivos.pdf>.

**COLLINS, Tony; et al.** "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases". *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 29, n°1 (2015), (Francia), pp. 3-23.

**COMAN, Gigi; & BAHIM, Gabriela.** "Optimization of xylanase production by *Streptomyces sp P12-137* using response surface methodology and central composite design". *Annals of Microbiology*, Vol. 61, n°4 (2011), (Rumania), pp. 773-779.

**CORNISH-BOWDEN, Athel.** "Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics". *Perspectives in Science*, Vol. 1, n°1-6 (2014), (Francia), pp. 74-87.

**DASHTBAN, Mehdi; et al.** "Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives". *International journal of biological sciences*, vol 5, n° 6 (2009), (Canadá), pp. 578-595.

**DORNEZ, Emmie; et al.** "Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing". *Trends in Food Science & Technology*, vol 5, n° 6 (2009), (Bélgica), pp. 495-510.

**ESSAYS UK.** *Submerged And Solid State Fermentation Biology Essay*. [En línea]. [Consulta: 30 de Enero 2018]. 2017. Disponible en: <https://www.ukessays.com/essays/biology/submerged-and-solid-state-fermentation-biology-essay.php?cref=1>.



**GOMES, Joel; & STIENER, Wilson.** "Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme". *Journal of Biotechnology*, vol 37, n° 1 (1994), (Austria), pp. 11-22.

**GOTE, Manoj.** *Isolation, purification and characterization of thermostable-galactosidase from Bacillus stearothermophilus (NCIM-5146)* (tesis) (doctorado). Universidad de Pune, Pune, India. 2004. [Consulta: 30 de Enero 2018]. 2017. Disponible en: <http://ncl.csircentral.net/347/1/th1405.pdf>.

**GUO, Haipeng; et al.** "Enzymes produced by biomass-degrading bacteria can efficiently". *Renewable Energy*, n° 109 (2017), (Canadá), pp. 195-201.

**IRFAN, Muhammad; et al.** "Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus sp.* in submerged fermentation". *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, n°9 (2016), (Pakistan), pp. 139-147.

**JAIN, Anita.** "Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces*". *Process Biochemistry*, vol 30, n° 8 (1995), (India), pp. 705-709.

**JOSELEAU, Jean; et al.** "Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls". *Elsevier*, (1997), (Francia), pp. 1-15.

**JUTURU, Veeresh; & WU, Jin.** "Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications". *Biotechnology Advances*, vol 30, n° 8 (2011), (Singapur), pp. 10-11.

**KARIMI, Keikhosro; & TAHERZADEH, Mohammad.** "Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review". *BioResources*, vol 2, n° 4 (2007), (Suecia), pp. 707-738.

**LABOME.** "Detergentes: Triton X-100, Tween-20, y más". *Mater Methods*, Vol3, (2013), (Estados Unidos), pp. 3-163.

**LOPEZ, Leonor; & TORRES, Carola.** *Hipertextos del área de biología*. [En línea] . [Consulta: 28 de Enero 2018]. Argentina: 2006. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>.

**MAHESWAR, Uma; & SATYANARAYANA, Rao.** "Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and Ca independent  $\alpha$ -amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants". *Letters in Applied Microbiology*, nº36 (2003), (India), pp. 191-196.

**MATLOCK, Brian; et al.** "Analyzing Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers". *Thermo Scientific*, (2007), pp. 1-2.

**MILLER, Gail.** "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination". *Analytical Chemistry*, vol 31, nº 3 (1959), (Estados Unidos), pp. 426-428.

**MILLER, James; & MILLER, Jane.** *Estadística y Quimiometría para Química Análítica*. Cuarta ed. Madrid, España: Pearson Education, 2002.

**MOTTA, Fernanda; et al.** *A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications*. Campiñas, Brasil: Intech, 2013.

**MUTHEZHILAN, Radhakrishnan; et al.** "Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation". *African Journal of Microbiology Research*, (2007), (India), pp. 20-28.

**NEIRA, Miguel.** Introducción Teórica *Fundamentos de Espectrofotometría*. [En línea]. [Consulta: 28 de Enero 2018]. Chile: 2010. Disponible en: [https://www.u-cursos.cl/odontologia/2010/2/OD0903/1/material\\_docente/bajar?id\\_material=566977](https://www.u-cursos.cl/odontologia/2010/2/OD0903/1/material_docente/bajar?id_material=566977).

**PALANISWAMY, Muthusamy; et al.** "Isolation, identification and screening of potential xylanolytic enzyme from litter degrading fungi". *African Journal of Biotechnology*, vol 7, nº 11, (2008), (India), pp. 1978-1982.

**PORTO, Alejandro.** *Enzimas*. [En línea]. [Consulta: 31 Enero 2018]. España: 2012. Disponible en: <http://www.bionova.org.es/biocalst/tema14.htm>.

**PRASAD, Yagya; & QIN, Wensheng.** "Characterization of Novel Cellulase-producing Bacteria". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, nº 177 (2015), (Canadá), pp. 1186-1198.

**RAGAUSKAS, Arthur; et al.** "The path forward for biofuels and biomaterials". *Science*. Vol 311, nº484 (2006), (Estados Unidos), pp. 484-489.

**RAWASHDEH, Rifaat; et al.** "Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace". *African Journal of Biotechnology*, Vol 3, n°4 (2005), (Jordania), pp. 251-255.

**SHARMA, Anup; et al.** "Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*". *World J Microbiol Biotechnol*, n°23, (2007), (India), pp. 483-490.

**SUBRAMANIYAN, Selvam; & PREMA, Prem.** "Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application". *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol 22, n°1 (2002), (India), pp. 33-64.

**SUNNA, Anwar; & ANTRANIKIAN, Gellert.** "Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria". Vol 17, n°1 (1997), (Alemania), *Critical Reviews in Biotechnology*, pp. 39-67.

**SUN, Ye; & YIAJANG, Cheng.** "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review". *Bioresource Technology*, Vol 83, n°1 (2002), (Estados Unidos), pp. 1-11.

**SUZUKI, Haruo; & TERADA, Tomohiko.** "Removal of dodecyl sulfate from protein solution". *Analytic Biochemistry*, Vol 172, n°1 (1988), (Japon), pp. 259-263.

**TAHERZADEH, Mohammad; & KARIMI, Keikhosro.** "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review". *International Journal of Molecular Sciences*, Vol 9, n°9 (2008), (Suecia), pp. 707-738.

**UNIÓN INTERNACIONAL DE QUÍMICA PURA Y APLICADA .** "Symbolism and terminology in chemical kinetics". *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 53, (1981), (Canadá), pp. 753-771.

**USUI, Kengo; et al.** "XynX a possible exo-xylanase of *Aeromonas caviae* ME-1 that produces exclusively xylobiose and xylotetraose from xylan". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 53, n° 8 (1999), (Japon), pp. 1346-1352.

**VERMA, Dijvijay; & SATYANARAYANA, Rao.** "Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases". *Bioresource Technology*, Vol 117, (2012), (India), pp. 360-367.

**VIKARI, Liisa; et al.** "Lignocellulosic ethanol: From science to industry". *Biomass and Bioenergy*, Vol. 46, (2012), (Finlandia), pp. 1-12.

**WONG, Ken; et al.** 1988. "Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications". *Microbiological Reviews*, Vol. 52, nº 3 (1988), (Canadá), pp. 17-305.

## ANEXOS

### Anexo A: Registro de los análisis realizados



**Lakehead**  
UNIVERSITY

Wensheng Qin, Ph. D  
Department of Biology, Lakehead University  
955 Oliver Road, Thunder Bay, Ontario, P7B 5E1, Canada  
Tel: 807-343 8467, Fax: 807-346 7796  
Email: [wqin@lakeheadu.ca](mailto:wqin@lakeheadu.ca)

The following report includes the analysis executed by Chemical Engineering student Solis Carranza Terry Miguel for the development of his research project (topic): **Optimization of Xylanase Production by *Bacillus sp. K1* Using Lignocellulosic Residues for the Biology Department of Lakehead University, Canada.**

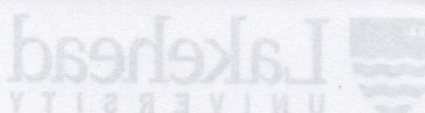
The absorbance of the samples was measured using an EPOCH microplate spectrophotometer per triplicate.

- Xylose Calibration curve:

Xylose concentration (µg/ml)	A1	A2	A3
0 (Control)	0,111	0,118	0,109
100	0,66	0,697	0,673
200	1,131	1,248	1,214
300	1,695	1,787	1,779
400	2,202	2,37	2,37
500	2,343	2,655	2,758
600	*	3,572	2,603
700	3,493	3,788	3,572
800	3,807	3,882	3,978
900	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW
1000	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW

Wensheng Qin





- Optical Density for 6 days analysis

Incubation time(h)	A1	A2	A3
0 (Control)	0,103	0,08	0,089
12	1,079	*	0,916
24	1,077	0,872	0,761
36	1,116	0,737	0,667
48	1,185	0,894	0,753
60	1,191	0,871	0,87
72	1,122	0,818	0,718
84	1,163	0,949	0,908
96	1,013	0,867	0,889
108	0,842	0,924	0,852
120	1,032	0,868	0,845
132	0,944	0,804	0,657
144	0,877	0,767	0,844

- Protein Concentration for 6 days analysis

Incubation time (h)	A1	A2	A3
Control	0,346	0,343	0,347
0	0,435	*	0,454
12	0,486	*	0,53
24	0,461	0,584	*
36	0,457	0,566	0,567
48	0,508	0,568	0,516
60	0,605	0,542	0,493
72	0,701	0,58	0,513
84	0,775	0,647	0,655
96	0,701	0,641	0,624
108	0,818	0,629	0,643
120	0,811	0,635	0,643
132	*	0,655	0,683
144	0,746	0,772	0,816

Wensheng Qin

Wensheng Qin



- Xylanase Assay for 6 days analysis

Incubation time (h)	1	2	3
0 (Control)	0,136	0,127	0,118
12	1,027	0,986	0,94
24	0,932	0,875	0,946
36	0,941	1,056	1,04
48	*	0,902	0,825
60	*	0,921	0,851
72	*	0,558	0,588
84	*	0,768	0,778
96	*	0,691	0,796
108	*	0,726	0,74
120	*	0,513	0,542
132	*	0,579	0,656
144	*	0,574	0,618

- Xylanase Assay for pH optimization

pH	A1	A2	A3
Control	0,153	0,153	0,153
4	1,013	0,993	0,934
5	0,866	0,904	1,026
6	1,394	1,302	1,111
7	0,986	1,027	0,966
8	1,132	1,075	1,158
9	0,662	0,532	0,606

Wensheng Qin





- Optical density for pH optimization

pH	OD 1	OD 2	OD 3
4	0,726	*	0,821
5	0,585	0,809	0,813
6	0,934	0,865	0,953
7	0,461	0,545	0,543
8	*	0,64	0,524
9	0,712	0,716	0,858

- Xylanase Assay for inoculum volume optimization

INOC. VOLUME (%)	A1	A2	A3
CONTROL	0,11	0,115	0,135
0,5	1,095	*	1,24
1	1,285	1,371	1,414
2,5	1,294	1,316	1,218
5	1,178	1,207	1,2
7,5	0,67	0,705	*
10	1,168	1,129	1,064

Wensheng Qin

Wensheng Qin





- Optical Density for inoculum volume optimization

INOC. VOLUME (%)	A1	A2	A3
CONTROL	0,089	0,099	0,105
0,5	1,063	1,001	0,976
1	1,103	1,067	1,04
2,5	1,132	1,073	1,081
5	0,99	1,083	1,099
7,5	1,115	1,118	1,108
10	1,165	1,189	1,138

- Xylanase Assay for temperature optimization

Temperature (°C)	A1	A2	A3
Control	0,103	0,101	0,101
25	*	1,28	1,32
30	0,758	0,988	1,01
35	1,353	1,41	1,335
40	0,963	0,984	0,968
45	1,011	1,052	0,974
50	0,585	0,597	0,571

Wensheng Qin

W. Qin



- Optical Density for temperature optimization

Temperature	OD1	OD2	OD3
Control	0,103	0,101	0,101
25	*	1,123	1,279
30	0,923	0,909	*
35	0,712	*	0,945
40	1,12	1,115	1,135
45	1,032	0,959	1,025
50	0,935	0,978	1,015

- Xylanase Assay for carbon source optimization with purified sugars

Carbon source (purified sugars)	A1	A2	A3	Control
SUCROSE	2,052	*	2,132	1,44
SORBITOL	0,364	0,453	0,496	0,165
FRUCTOSE	2,324	*	2,253	1,972
LACTOSE	*	2,822	2,938	2,589
GLUCOSE	2,55	2,641	2,646	1,79

Wensheng Qin





- Xylanase Assay for carbon source optimization with lignocellulosic residues.

Carbon source (lignocellulosic residues)	A1	A2	A3	Control
CORN STOVER	*	0,311	0,317	0,147
WHEAT STRAW	0,156	0,171	0,164	0,147
WHEAT BRAN	0,852	0,906	0,903	0,147
ELM LEAVES	0,272	0,252	0,225	0,147
WOOD DUST	0,207	0,185	0,173	0,147
XYLAN	1,052	1,074	0,952	0,147

- Xylanase Assay for carbon source percentage optimization.

Wheat bran %	A1	A2	A3	Acont
0,5	*	1,114	0,933	0,335
1	1,139	1,278	1,273	0,46
2	0,779	0,862	1,138	0,387
3	1,378	1,306	1,404	0,697
4	*	1,714	1,607	0,838
5	*	1,424	1,508	1,173

Wensheng Qin

*Wensheng Qin*

*Wensheng Qin*



- Xylanase Assay for inorganic nitrogen source optimization.

INORGANIC NITROGEN SOURCE (1%)	A1	A2	A3	Acont
KNO <sub>3</sub>	1,57	1,63	1,462	0,355
NaNO <sub>3</sub>	1,524	1,564	1,473	0,335
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,793	1,701	*	0,476
NH <sub>4</sub> Cl	*	2,131	2,257	1,206
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	*	2,133	2,142	0,958

- Xylanase Assay for inorganic nitrogen source percentage optimization.

% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	2	3	Acont
0,5	1,682	1,665	*	0,357
1	1,649	*	1,66	0,644
2	1,402	1,505	1,385	0,517
2,5	1,439	1,502	1,295	0,482
3	1,474	1,621	*	0,494
4	1,933	1,936	2,131	1,136

- Xylanase Assay for inorganic nitrogen source optimization.

Organic nitrogen source (1%)	A1	A2	A3	A cont
PEPTONE	1,73	*	1,708	0,424
MALT EXTRACT	1,927	2,064	2,074	0,836
TRYPTONE	1,432	1,481	1,558	0,546
UREA	1,296	1,203	1,394	0,502
YEAST EXTRACT	*	1,621	1,656	0,4

Wensheng Qin

WQin





- Xylanase Assay for nitrogen/ carbon sources relation optimization.

Carbon/ Nitrogen source Relation	A1	A2	A3	A cont
8:1:1	2,155	1,863	*	0,533
8:1:2	1,849	1,593	1,579	0,436
8:1:4	2,885	*	2,905	2,422
8:1:5	*	3,108	3,025	2,747
8:1:6	3,53	3,46	3,576	2,654
8:1:8	2,661	2,49	2,65	2,341

- Xylanase Assay for effect of metal ions and surfactants

1mM METAL ION/ 0.1% SURFACTANT	A1	A2	A3	Acont
Control	1,855	*	2,193	0,666
Na+	1,585	1,395	1,316	0,488
K+	1,292	1,317	1,454	0,427
Mg ++	1,619	1,667	1,581	0,478
Ca++	1,542	1,472	1,588	0,415
Fe++	1,84	1,736	1,706	0,542
Ni++	1,48	1,559	1,527	0,523
Cu++	1,971	1,92	2,098	1,479
Co++	1,987	1,718	1,864	0,776
Mn++	*	1,014	1,329	0,442
TWEEN-20	1,777	*	1,446	0,481
SDS	2,707	*	2,692	0,67
TRITON X-100	*	1,752	1,892	0,604

\* Abnormal data.

Wensheng Qin

**Anexo B:** Aprobación del proyecto de investigación por parte del departamento de biología de la universidad de Lakehead, Ontario, Canadá.



DEPARTMENT OF BIOLOGY  
t: (807) 343-8460 f: (807) 346-7796

Wensheng Qin, Ph. D  
Department of Biology, Lakehead University  
955 Oliver Road, Thunder Bay, Ontario, P7B 5E1, Canada  
Tel: 807-343 8467, Fax: 807-346 7796  
Email: [wqin@Lakeheadu.ca](mailto:wqin@Lakeheadu.ca)

November 20, 2017

Re: ESPOCH Chemical Engineering Student Solis Carranza Terry Miguel's  
Request of Authorization for His Bachelor Degree Thesis

To Whom It May Concern,

This letter is to support ESPOCH Chemical Engineering student Solis Carranza Terry Miguel's request of authorization for his bachelor degree thesis. His research project (topic) is: **Optimization of Xylanase Production by *Bacillus sp. K1* Using Lignocellulosic Residues for the Biology Department of Lakehead University, Canada.** His work includes components of biological engineering, fermentation, biochemical characterization, and so on.

His thesis research was conducted in the Biotechnology Laboratory for Enzymes, Bioproducts & Bioremediation at Lakehead University, under my supervision, with excellent direct supervision and training to Terry by Dr. Yang Liu (visiting professor in my lab). Terry has been a hard-working student in the lab, learned and developed a series of working skills and gained some very interesting results.

Please feel free to contact if any further information is needed!

Sincerely yours,

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "W. Qin", written over the typed name "Wensheng Qin".

Wensheng Qin



## Anexo C: Detalle de los procedimientos experimentales

### Anexo C-1

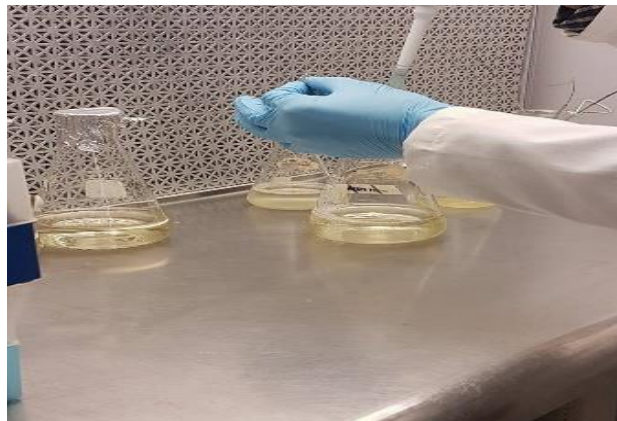
A)



B)



C)



### Anexo C-1: Preparación de la bacteria *Bacillus sp. K1*

A) Bacteria preservada a -83°C

B) Siembra de la bacteria en cajas Petri

C) Activación de la bacteria

## Anexo C-2

A)



B)



C)



D)



### Anexo C-2: Procedimientos analíticos

- A) Toma de muestras del medio de fermentación para posterior congelación a 4°C
- B) Muestras de medio de fermentación para análisis de densidad óptica
- C) Centrifugación de las muestras descongeladas para método de Miller
- D) Muestras listas para lectura por espectrofotometría, por el ensayo de Miller



### Anexo C-3

A)



B)



#### **Anexo C-3: Diseño experimental para verificar producción de xilanasa y optimizar parámetros físicos**

A) Inoculación para verificar la producción de xilanasa durante 6 días

B) Inoculación para optimizar parámetros físicos (pH, temperatura y volumen de inóculo).

#### Anexo C-4

A)



B)



C)



D)



E)



#### Anexo C-4: Diseño experimental para optimizar la composición del medio de fermentación

- A) Diseño experimental para determinar fuentes óptimas de carbono
- B) Diseño experimental para determinar porcentaje de afrecho de trigo óptimo.
- C) Diseño experimental para determinar la fuente óptima de nitrógeno inorgánico.
- D) Incubación para determinar la fuente óptima de nitrógeno orgánico
- E) Diseño experimental para determinar el efecto de iones metálicos y surfactantes